

===== INSTITUTO DE ESPAÑA =====
REAL ACADEMIA DE FARMACIA

ORDEN Y ESTABILIDAD
EN LOS SISTEMAS BIOLOGICOS

POR EL

EXCMO. SR. D. ENRIQUE OTERO AENLLE

DISCURSO LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 14 DE JUNIO
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
Y CONTESTACIÓN POR EL

EXCMO. SR. D. RICARDO MONTEQUI Y DIAZ DE PLAZA



MADRID, 1973

ORDEN Y ESTABILIDAD EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

DISCURSO PRONUNCIADO POR
EL EXCMO. SR. D. ENRIQUE OTERO
AENLLE, EN LA
SESIÓN PÚBLICA CELEBRADA PARA
TOMAR POSESIÓN DE LA PLAZA DE
ACADÉMICO DE NÚMERO DE LA REAL
ACADEMIA DE FARMACIA, EL DÍA
14 DE JUNIO DE 1973.

EXCMO. SR. PRESIDENTE.

EXCMOS. SRES. ACADÉMICOS.

SRAS. y SRES.

En estos momentos, en los cuales y merced a la generosidad de los miembros de esta Real Corporación, voy a ocupar un lugar de igualdad entre vosotros, desearía disponer de un lenguaje cálido y sin limitaciones, para poder expresar la trascendental emoción que me embarga y el sentimiento de profunda gratitud que a todos debo, por el alto honor que con ello me habéis otorgado. Y para justificarme ante la propia conciencia por esta distinción, pienso en algún valor constante que se refiera a nuestras relaciones mutuas y que reuniendo, de algún modo, actos de afecto y colaboración, pudiera resumirlos, por mi parte, en una fidelidad total a todo lo que la Real Academia de Farmacia representa. Por eso me permito recordar aquí el primer contacto que tuve con esta ilustre Corporación, allá por el año cuarenta y dos, cuando por haber obtenido el Premio Nacional de la misma, recibí la lógica alegría de verme incorporado a ella como miembro correspondiente, ya que en esa época, dicho título iba unido a la concesión del citado premio. Creo que desde entonces podré haber tenido muchos desaciertos, pero no dudo en afirmar que mis actos y mi conducta desearon ser siempre fieles al espíritu y la norma de esta Casa y de respeto a las ilustres personas, que, sucesivamente, la formaron y dirigieron. Aun desde las lejanas latitudes de ulteriores destinos, procuré asistir, en todo lo posible, a sus actividades científicas o sociales, con lo cual he ido cimentando, a lo largo de los años, sólidas y entrañables relaciones. A ello, más que a nuestros méritos y valía personal, atribuyo el que, incorporado de nuevo a la docencia en Madrid, me llamaseis a vuestro seno. para unirme, de manera definitiva, a las tareas que con tanta eficacia venís desarrollando. Gracias. Sres. Académicos,

por esta acogida llena de cordialidad que me habéis dispensado y que supone alumbrar una esperanza que quisiera no defraudar.

Al presentarme como Académico de número, con el preceptivo discurso, la natural preocupación responsable que me inquieta, se ve compensada por la presencia de tantos buenos amigos, que no dudo serán comprensivos con esta disertación, pero también me acongoja la ausencia de algunos que me honraron con sus atenciones y me concedieron, gentilmente, su voto y que hoy ya no están entre nosotros. Permitidme que dedique, en este sentido, un recuerdo especial a mi antecesor en la Cátedra, el profesor Portillo, con quien trabajé varios años en el duro laborar universitario y cuya hombría de bien y recta inteligencia, le distinguieron siempre en una ejecutoria ejemplar.

Tampoco puedo dejar de recordar, en esta ocasión, al ilustre compañero a quien vaya suceder en esta Casa, el Dr. D. Manuel García de Mirasierra, a quien conocí por vez primera hace casi treinta y cinco años, en circunstancias difíciles para nuestra Patria y para nosotros mismos. El encargo que por la superioridad se me había ordenado realizar en Ciudad Real, se vio facilitado por su inestimable ayuda y por sus amplios y seguros conocimientos de toda la problemática sanitaria de aquella provincia.

Nacido el Dr. Mirasierra en Alcalá la Real, en la provincia de Jaén, cursó y terminó muy joven sus estudios en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, habiendo sido alumno predilecto del destacado catedrático de Análisis de medicamentos don Obdulio Fernández. Al poco tiempo de finalizar su carrera, gana por oposición la plaza de Jefe del Departamento de Análisis del Instituto Provincial de Higiene de Ciudad Real, desde cuyo puesto ejerció una decisiva influencia en la significativa actuación de todos los farmacéuticos de aquella provincia. Contribuyendo, con su entusiasmo y eficacia gestora, a la creación, en el año 1932, de una de las primeras cooperativas farmacéuticas provinciales de España. Asimismo, desempeñó, en varias ocasiones, la Presidencia del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Ciudad Real, desde la cual desarrolló una brillante labor, prestigiando con ello a toda la clase farmacéutica. Por su capacidad organizadora y sus méritos profesionales, fue nombrado Inspector Provincial de Farmacia, Director del Cen-

tro Regional de Farmacobiología y ganó, en unas reñidas oposiciones, el cargo de Jefe de los Servicios de Análisis Clínicos de la Beneficencia Provincial. Sintiendo también una indudable atracción docente, fue Profesor de Ciencias de la Escuela Profesional de Maestría de aquella Ciudad.

Como figura reconocida en el ámbito farmacéutico Nacional, le fue concedida, en 1954, la medalla Carracido y, posteriormente, se le requiere por la Dirección General de Sanidad para ejercer la Jefatura de la Inspección Técnica en la Subdirección General de Farmacia. En julio de 1969 fue nombrado Subdirector General.

Puede decirse, sin temor a exagerar, que su vida estuvo en todo momento entregada al ejercicio y defensa de la profesión farmacéutica en sus más nobles aspectos, en la que, si tuvo éxitos notorios, también sacrificó a la misma una importante parcela de su bienestar y tranquilidad familiar. Algunas de sus actuaciones públicas estuvieron centradas en esta Casa, donde contaba con el cariño y admiración de quien prestó a la misma importantes servicios. Los que le tratamos personalmente no olvidaremos su gran calidad humana, llena de simpatía y comprensión, sin mengua de un estricto sentido de la justicia. Que Dios le haya concedido su eterna Paz.

INTRODUCCIÓN

La ordenación molecular como fundamento de ciertos procesos: físico-químicos, ha sido objeto de nuestras investigaciones desde hace bastantes años. Ya al estudiar la técnica de la espumación (1), comprobamos cómo la estabilidad de la espuma estaba condicionada a la existencia de una película con una elevada coesión, formada por moléculas filiformes ordenadas, en la cual, tanto la concentración como el pH y la presencia de electrolitos ejercían una influencia decisiva en su rigidez superficial. Así, operando en condiciones adecuadas con estas variables, pudimos realizar, en buenas condiciones, la separación de fermentos, colorantes, ácidos grasos, bacterias, etcétera, por un método que supone una auténtica microflotación (2). La capacidad humectante y la actividad capilar de las sales de los ácidos grasos fue atribuida por nosotros, no sólo a una simple adsorción superficial, regida por la ley de Gibbs, sino a un estado molecular ordenado con formación de agregados micelares de tipo laminar o cilíndrico (3).

El estudio de estos problemas nos llevó a realizar con nuestros principales colaboradores, los profesores García Fernández y Cadórniga Carro, diversos trabajos que se refieren a la presencia de agrupaciones moleculares en líquidos biológicos (4), su importancia en los procesos de emulsificación originados por ciertos mucílagos (5), así como la influencia de determinadas sustancias tensioactivas en la extracción de algunos alcaloides (6). Algunas de estas investigaciones fueron presentadas sucesivamente en esta Academia (7).

Con objeto de ampliar el horizonte sobre estos problemas, se abordó el conocimiento de las técnicas de capas monomoleculares, con los profesores Guastallá y Dervichian, en la Universidad de París y en el Instituto Pasteur. Esto nos permitió montar, en nuestros laboratorios de la Facultad de Farmacia de Santiago, unos micromanómetros superficiales dotados de una sensibilidad elevada e iné-

ditas en España, estableciendo unos equipos de trabajo y unas líneas de investigación sobre interacciones superficiales de interés biológico y farmacéutico, que, más tarde, darían lugar a una escuela de probada eficacia y relevante interés. Un grupo de investigación análogo, hemos dejado dispuesto asimismo en la Facultad de Farmacia de Barcelona. A su vez se abordó el conocimiento de las asociaciones moleculares e interacciones medicamentosas a través del estudio de -diversas técnicas físico-químicas, todo lo cual dio origen a una espléndida floración en la Escuela de Farmacia Galénica de Santiago.

En la actualidad nuestro interés se ha centrado en la ordenación y estabilidad de los lípidos en la membrana celular y su alteración por diversos agentes exógenos, operando en capas monomoleculares, rayos X, diagramas de fases, difusión de la luz, liposomas o «black films». Asimismo estudiamos las interacciones de los lípidos con el citocromo c y el coenzima Q, para conocer el papel que aquéllos pueden representar en la cadena respiratoria y, en general, diversos procesos ligados al orden y estabilidad en distintos sistemas de interés biológico.

La disposición mental que condicionaba toda esta problemática, así como el haber conocido las intervenciones y los debates que, sobre esta cuestión, se desarrollaron en el «Instituto de la Vida» de París en 1969 (8), Y el compró bar, personalmente, en el I Congreso Europeo de Biofísica de Viena y en el IV Internacional de Moscú, como el problema de la ordenación y estabilidad molecular constituían un tema básico, que se encontraba presente en la mayoría de las comunicaciones allí expuestas, nos indujeron a considerar que una exposición general del mismo pudiera ser apropiada para nuestro discurso de ingreso en esta Academia, ya que presenta un interés fundamental en todas las Ciencias Biológicas y en consecuencia, en las Ciencias Farmacéuticas.

A veces nos hemos preguntado dónde estaría la raíz oculta que nos impulsaba en esta línea de trabajo: parece que habíamos olvidado que al estudiar en 1935 un nuevo compuesto del wolframio con la oxiquinoleína, ya percibíamos la necesidad de un estudio conformacional de su estructura, análogo a los que hoy se determinan en los biopolímeros y que también se ha establecido para los iso y heteropolianiones de aquel elemento (9).

Es indudable por tanto que, como se ha dicho mil veces, desde Dilthey, la peculiaridad de cada hombre es una mezcla de azar, destino y carácter. Al releer esta frase en una reciente obra (10), vino a mi memoria la figura del joven y prestigioso profesor, que, en las aulas de Fonseca, sujetó a normas mi azarosa vida de estudiante, trazó con profundidad radical las rutas de mi destino y marcó con huella indeleble los rasgos de mi carácter. Sabéis que estoy hablando de mi querido maestro D. Ricardo Montequi, hoy Director de esta Academia, quien en nuestras primeras singladuras universitarias me distinguió de forma especial, ligándome más tarde a sus trabajos y desvelos en la investigación y la enseñanza y que ahora me honra al contestar al discurso que vaya someter a vuestra consideración. El me describe, a veces, con cariño y nostalgia, las visitas que a su laboratorio realizaba, anualmente, mi bondadosa madre, para agradecerle el afecto que me otorgaba y su firme voluntad mostrada respecto a la formación que me era necesaria, llenando el vacío y la soledad paternal que me faltaban. Desde aquellas horas primerizas, mi vida intelectual y científica, así como la propia familiar, quedaron vinculadas sin fisuras a su persona. No puedo olvidar, por lo que tiene de símbolo de cordial distinción y generosa ayuda, que antes de que me hubiera licenciado no tuvo reparos en asociarme con su nombre, ya consagrado, en lo que había de ser mi primer trabajo de investigación. Esto hizo nacer para siempre en nosotros aquella decisiva actitud vocacional, que, llegando hasta las zonas más sensibles de cada hombre, está por encima de cualquier acontecer histórico circunstancial.

En frase aristotélica, el profesor Montequi siempre estuvo dispuesto al asombro y a la duda. Por eso sus enseñanzas, como su postura ante la vida, estaban en buena dirección para un sereno discurrir filosófico, no exento de ironía, sabiendo que la educación integral del hombre comporta una síntesis intelectual, anímica y espiritual, que no puede sustituirse por ningún avance de la técnica o del progreso, pero siempre con un sentido dinámico, que no le haga caer en el mero pensar sin actuar, que es lo mismo que no pensar. Así en su escuela, sentíamos sus discípulos, como una realidad diaria, con gran sentido analítico e integrador, lo que muchos años más tarde, Gastón Berger (11) define como las premisas fundamen-

tales de un buen maestro: «El amor a lo que se enseña, la atención afectuosa con que se mira a aquellos a quienes se instruye, el respeto de su personalidad, el ingenio que hay que desplegar constantemente para inculcar los nuevos conocimientos en los espíritus jóvenes y para descubrir sus aptitudes, despertando en los mismos el entusiasmo riguroso ante los problemas desconocidos y a veces hostiles, alimentando sin tregua una inquietud de creación renovadora y desarrollando sus fuerzas para ponerlos en condiciones de andar solos su propio camino.»

Muchas horas hemos pasado juntos, realizando tareas en las que creíamos y al calor de esa colaboración desinteresada, descubríamos, gozosamente, que poco a poco nos iba uniendo uno de los valores, más selectos de la condición humana: la íntima amistad. En este caso, nunca empañada por causa alguna. En todas las ocasiones y en todas las circunstancias siempre estuvimos unidos. En las alegrías y los triunfos, y en las horas amargas que la vida siempre deja al pasar. Creo, sinceramente, que esto es lo más positivo en una buena contabilidad moral.

Por eso, aunque fue necesario que nos alejáramos geográficamente y no tuve la satisfacción de poder continuar la docencia en su misma disciplina, él ha sido mi Maestro de siempre, mi verdadero Maestro; el que me ha enseñado los fundamentos doctrinales de la Ciencia y las normas rigurosas y pacientes de la investigación. Y un conjunto de virtudes esenciales para su desarrollo: seriedad y objetividad, libertad de juicio, espíritu abierto a todos los horizontes, ser adaptables y perfectibles y, sobre todo, aprender a aprender, o sea, aumentar la capacidad de análisis y de síntesis, en lugar de limitarse tan sólo a un adiestramiento técnico que pudiera quedar anticuado en breve plazo. Esta formación, orientada desde un principio, cultivando con sinceridad las dos cualidades citadas, que necesitan un constante ejercicio, nos ha permitido librarnos de un posible anquilosamiento, que hubiera podido anular toda nuestra preparación científica o el conocimiento técnico adquirido en nuestra juventud.

Muchas cosas importantes se podrían seguir diciendo del doctor Montequi y aquí se han dicho, no hace mucho tiempo, por un ilustre Académico: el profesor Doadrio. Las cualidades de la escuela de-

Montequi, que aquél, como uno de sus discípulos más allegados, enumera, son las mismas que yo he vivido con anterioridad en mi propio conocimiento. Esto acredita una línea de conducta inalterable y la verdad de lo que en ella se practicaba y enseñaba. Todos los que a su lado nos hemos formado, repetiríamos los mismos conceptos. Esto puede ser la mayor alabanza a una clara «misión universitaria», en el sentido orteguiano, por la que todos sus discípulos y colaboradores le debemos una gratitud difícil de valorar.

No quisiera olvidar en esta ocasión a los que en la intimidad del hogar, me dieron, en todo momento, ejemplo de honradez y tenacidad y que con su amor, lealtad y espíritu comprensivo, me han alentado siempre en la consecución de los más elevados ideales. A todos ellos mi recuerdo y agradecimiento más entrañables.

LA REVOLUCIÓN BIOLÓGICA

El siglo XIX, trenzando la lanzadera mecánica en el telar, contempló el acelerado desarrollo de la «Revolución Industrial», con todas las implicaciones económicas y sociales que la misma contenía en su propio planteamiento. Finalizaba el siglo, cuando el positivismo naturalista, integrado en las teorías filosóficas de Augusto Comte, sentó su pretenciosa doctrina de la explicación mecanicista del Universo, que consideraba predeterminado el devenir de todos los sistemas de la Naturaleza, de acuerdo con las cuatro reglas canónicas de Stuart Mill (12). Como consecuencia de esta mentalidad, que a medida que se va afianzando como creencia histórica, aparece cada vez más difusa y sin perfiles definidos en el campo de la Ciencia; surgen formas más elaboradas de su contenido filosófico, como el «materialismo dialéctico» de Marx y Engels o el «monismo científico o evolucionista» de Ostwald o Haeckel. La posición resueltamente contraria de Bergsón, que contrapone materia y vida y distingue el tiempo espacializado con que la causalidad mecánica opera, de la duración propia de los fenómenos vitales, así como el anti-intelectualismo de Nietzsche, conducen a una posición crítica del conocimiento científico, que hace considerar a Boutroux cómo en la Naturaleza se produce la inversión de las leyes deterministas: cuanto más necesaria menos determinante es la ley natural y cuanto más determinante menos necesaria, lo que parece ya un anticipo de los conceptos biológicos actuales. Tratábase pues de una verdadera «crisis de principios». Surgió entonces lo que podemos llamar la «Revolución atómica», que fue desarrollándose con expectante ilusión, no exenta de inquietud, en toda la primera mitad del siglo XX.

En los últimos cincuenta años la Química ha experimentado, por otra parte, un doble proceso de integración y unificación: por un lado se ha integrado cada vez más en la Física, y se ha unificado

a sí misma a través de las concepciones de la mecánica cuántica, especialmente en lo que se refiere a los enlaces de valencia, estructuras conformacionales, procesos estereoquímicos y la misma Química de coordinación, que como ha expuesto recientemente en esta Academia nuestro compañero el doctor Doadrio (13), ha hecho desaparecer, en realidad, los antiguos capítulos tradicionales de la Química orgánica e inorgánica.

Los procesos catalíticos, las reacciones concertadas y la química macromolecular, rozan ya el mundo biológico. Así los estudios bioquímicos y físico-químicos tienden a colaborar estrechamente para resolver problemas de índole celular, de genética, actividad vital, investigación embriológica y, en general, a expresar los fenómenos de la vida en lenguaje molecular, con lo que se van borrando, progresivamente, las fronteras que separan las investigaciones, cada día más audaces. que hasta ahora parecían pertenecer en exclusiva al dominio de la Física, la Química o la Biología. Puede decirse, por tanto, sin incurrir en una actitud novedosa, que nos encontramos en vísperas de la «Revolución Biológica», más inquietante aún que las anteriores, porque sus investigaciones fundamentales tienen como ecuación principal la vida misma. El panorama que ya se vislumbra es enormemente atrayente, de profunda exaltación dionisiaca, de peligrosa afirmación egocéntrica. diluida en un disimulado panteísmo, pero que, como la blanca montaña en la altitud, está llena de peligros y desconciertos, donde pueden naufragar los mejores espíritus llenos de angustia y de zozobra.

Sin embargo. el que el físico se atenga a su propia y peculiar experiencia, ha permitido que su mente y la de todos los hombres de ciencia. se abra a considerar una nueva metafísica del mundo real, que intenta ofrecer una visión coherente de la Naturaleza, desde una perspectiva totalmente distinta a la que se ha venido utilizando desde los tiempos de Galileo sobre los conceptos de espacio, tiempo, materia y causalidad. Las ideas actuales nos sitúan más cerca de Platón y de Aristóteles que del racionalismo kantiano (14), por lo cual es preciso ver los cuerpos materiales como condensaciones de energía, diversamente estructurada. siendo entonces la clave de la Ciencia de la Naturaleza la llamada por Zubiri «ley estructural», considerando a los sistemas biológicos como uno de sus hitos fundamentales.

Surge entonces uno de los grandes peligros del momento actual. Intentar desvelar el secreto de la vida a través de una ley biológica que considere posible deducir todos los fenómenos vitales en términos físico-químicos, generalizando, incluso, sus posibles esquemas conceptuales no sólo al dominio de estos procesos, sino al terreno de la evolución cósmica, la Antropología, la Sociología, la Metafísica y el transcurrir histórico del hombre, como lo han abordado Teilhard de Chardin (13) y Monod (16) desde distintos puntos de vista filosóficos. Una crítica especialmente dura de la postura generalizada de Manad, en la que se le atribuye al azar el papel principal en la conformación de los sistemas biológicos, con mutaciones necesarias progresivas, es la realizada por George Salet, citado recientemente por Fernández Cruz (17), el cual indica cómo este autor, «aportando interesantes argumentos de Bioquímica molecular y apoyándose en la ley única del azar, formulada por Borel, demuestra, con incuestionables razonamientos matemáticos, que las mutaciones podrán ser en todo caso diferentes o regresivas, pero nunca progresivas». Esto pone en un aprieto el proyecto de Manad, de querer justificar el destino humano, en su finalidad, como una necesidad del evolucionismo biológico, inserto en el materialismo dialéctico.

No es nuestra intención plantearnos aquí la polémica que supone la contradicción epistemológica que parece existir entre el vitalismo metafísico de Bergsón, no finalista, con su consideración de la vida como una corriente o impulso radicalmente distinto de la materia inanimada, pero en lucha constante con ella, dificultándola para obligarla a organizarse y el vitalismo cientista de Elsaser y Polonyi con sus leyes biotónicas, en las que aparecen unos principios que vendrían a añadirse a los de la Física para explicar los sistemas vivientes: ni tampoco contraponer el concepto cientista de Spencer, a la proyección animista de Hegel, o a la inversión que en el razonamiento de este último autor se ha realizado, para justificar el materialismo dialéctico, como base de la evolución en el tiempo del hombre histórico. Sin embargo, es necesario afirmar que una teoría universal de los sistemas biológicos, tendrá que incluir hoy, necesariamente, los fundamentos de la mecánica cuántica y relativista, los esquemas estadísticos de los componentes elementales de la materia, la probabilidad de un microestado en un conjunto canónico colec-

tivo , la teoría de grupos, la termodinámica generalizada, y otros muchos conceptos difíciles de conjugar.

Con la humildad que inevitablemente acarrea la complejidad de los conocimientos actuales podemos expresar la conclusión de que, en la segunda mitad del siglo XX, sólo se puede apuntar el que una estructura biológica pudiera ser deducible a partir de los primeros principios. Es, no obstante, explicable con una previsión estadística.

Con todo, la gran ambición del siglo pasado, el relato científico y pormenorizado «de una Historia Natural de la Creación», va cumpliéndose hoy con bastante más rigor intelectual que en el famoso libro de Haeckel y con mucho mayor respeto humano a la «Naturaleza» y a su «Creación» (12).

SISTEMAS BIOLÓGICOS

Características generales

Al contemplar la situación crucial que en la revolución biológica vemos emerger inexorable en nuestros días, es conveniente enfocar el problema de los sistemas implicados en la misma, definiendo aquello que es común para todos ellos y fijando, con claridad, cuáles son sus caracteres generales, a los que se podrían aplicar las leyes y los conceptos fundamentales de la Física y de la Físico-química (18).

En primer lugar, es preciso considerar la separación entre lo que constituye la esencia de un ser vivo y la materia inanimada. Según Mendelssohn (19), esta línea de separación es la que se presenta también entre dos lenguajes: el del físico y el del biólogo. Según algunos autores, el lenguaje actual del físico no es suficiente, hasta ahora, para describir los fenómenos biológicos en su totalidad. Se plantea así el problema de la validez universal de las leyes físicas o el retorno al vitalismo.

No obstante, si consideramos que los físicos pueden hacer abstracción de la existencia de este principio vital, parece posible intentar una cierta explicación de las funciones de los sistemas biológicos en términos estructurales. Este ha sido el gran hallazgo de la Microbiología: el establecer la importante correlación de las propiedades y funciones biológicas con la estructura de determinadas macromoléculas o biopolímeros. Estas estructuras es cierto que son muy complicadas, en relación con las que se estudian en la Física, pero sus peculiaridades son inherentes a esta complejidad, y así se puede llegar a comprender que los caracteres biológicos más importantes se intenten expresar a nivel molecular y en relación con las teorías físicas actuales.

Entre estos caracteres distintivos, generales y simples, podemos indicar los siguientes (20) :

1.º) Las macromoléculas o biopolímeros que forman las estructuras de los sistemas biológicos, deben de presentarse siempre en un cierto orden, que no es sólo de tipo espacial ni trivial, sino que corresponde a un sentido más estricto, ya que regula la propia función del sistema.

2.º) Las técnicas experimentales que se utilizan para el estudio de las macromoléculas y su interpretación teórica, indican que, en estos casos, es necesario establecer un nivel de conocimiento que alcance a la conformación en el espacio de todos sus componentes y de las fuerzas que intervienen en su estabilización. Es decir, que la «forma» de cada sistema, es un carácter esencial para definir, en la mayoría de los casos, el tipo de función que puede desempeñar.

3.º) La reactividad química y la capacidad funcional de los sistemas biológicos están íntimamente relacionadas, asimismo, con problemas de simetría molecular u orbital, que es necesario tener muy en cuenta para asignar un parámetro más a cada molécula o grupo funcional, en el análisis de su conformación (21).

4.º) Todos los sistemas biológicos tienen extraordinarias propiedades dieléctricas, siendo capaces de presentar vibraciones con frecuencias de 10^{-11} a 10^{-12} seg.⁻¹, bien localmente o en ciertas regiones específicas. Estos dipolos eléctricos oscilantes pueden interactuar entre sí a largas distancias. Asimismo, se puede establecer una relación entre algunos efectos estereoquímicos de estos sistemas, los momentos magnéticos de sus moléculas y sus funciones bioquímicas (22).

5.º) En relación con determinados grados de libertad, las estructuras de los sistemas biológicos no existen en un estado de equilibrio: son sistemas activos que intercambian materia con el entorno, termodinámicamente abiertos y a través de los cuales fluye la energía, siendo capaces de improvisar modelos de conversión de la misma para su mejor estabilización.

En todos estos casos, es preciso hacer intervenir, como parámetro esencial de la transformación, la coordenada del tiempo.

6.º) Las entidades individuales que forman los sistemas biológicos presentan un alto grado de interacción, que puede ser de tipo estructural, topológico o temporal, con caracteres estereoespecíficos o

de tipo eléctrico o energético. En general, los biopolímeros deben adoptar en cada caso la disposición conformacional más favorable para que la orientación de sus centros activos confluyan en una acción coordinada que aumente la funcionalidad del sistema.

Como resumen de estas propiedades genéricas de los sistemas biológicos, se puede decir que los organismos vivos son como «una energía al servicio de una organización privilegiada». Esto corresponde a un valor entrópico mínimo, lo que les permite adecuarse a su condición teleonómica, que a través de un mecanismo de estructuración espontánea o morfogénesis autónoma, conserve sus caracteres de autorreproducción invariante.

A continuación analizaremos con más detalle el problema del orden y la energía al servicio de las estructuraciones moleculares, que definen mejor que ningún otro parámetro dichos sistemas, situándolos en íntima conexión con otros factores, de los cuales evidentemente dependen.

EL ORDEN BIOLÓGICO. REDUCCIONISMO E INTEGRACIONISMO

En el mundo biológico el concepto del orden se acepta como antítesis del caos. Sin embargo, esta palabra puede tener distintas significaciones, ya que es normal hablar de un orden más alto o más bajo para indicar distintos grados de perfección, una vez superado el desorden. Conviene entonces centrar la atención en las diferencias que pueden presentarse en los distintos grados de complejidad, expresados, en forma cuantitativa, por el número de partes de diferentes clases de las que está formado el sistema considerado. Un elevado orden no quiere decir una gran perfección, pues ésta sólo se alcanza con un máximo nivel de complejidad, en la que intervienen un gran número de componentes, situados en forma ordenada y poseyendo propiedades y funciones específicas, como ha expuesto Engelhardt en el último Congreso Europeo de Biofísica de Viena (23).

Las investigaciones biológicas que pueden determinar el grado de orden y complejidad en el sistema, se orientan de manera fundamental en dos líneas diferentes, que se conocen con el nombre de «organicismo» y «reduccionismo». El primer método de trabajo corresponde a considerar que un adecuado conocimiento de la naturaleza real

de las diferentes manifestaciones de la vida, sólo se puede abordar por el estudio directo de los objetos altamente organizados o sistemas a los cuales se les puede aplicar la terminología de vivientes. El reduccionismo investiga, por el contrario, los fenómenos biológicos fundamentales a nivel molecular.

La objeción de los organicistas, frente a los reduccionistas, se basa en el antiguo aforismo de que el «todo» es diferente a la suma de las «partes». La validez de esta afirmación es incuestionable, así como la consecuencia de que el conocimiento de la totalidad de un sistema no puede deducirse, simplemente, del estudio de las propiedades de las partes que lo componen. Consideradas así las cosas, los principios del reduccionismo aparecen como falaces y estériles en sus esfuerzos.

Sin embargo, como ha expresado Thorpe (24), uno de los participantes en el Simposium que sobre este tema se celebró en Austria en 1969 bajo la dirección de Koestler (25), el único camino de resolver el problema fundamental del conocimiento de los sistemas biológicos es «atacarlos por debajo», que es en esencia el fin del reduccionismo. La mayor dificultad consiste en trasladar los procesos que se presentan en la Naturaleza, siempre refinados y complejos, al nivel más bajo de investigación, que es el de las moléculas y de sus conclusiones poder deducir determinadas propiedades que sean válidas en su conjunto.

El reduccionismo implica, no obstante, una sola dirección investigadora, por lo cual es necesario plantearse, a su vez, el problema opuesto. Conocidas las propiedades de las partes analizadas, estudiar cómo éstas se integran para dar lugar a los aspectos diferenciales del conjunto, determinando las fuerzas que son responsables de esta integración. Así aparecerían los estados consecuentes de «orden jerarquizado», según la calificación de Needham (26), para formar una estructura más compleja y heterogénea.

El integracionismo puede así considerarse como un complemento del reduccionismo. Este último es el punto de partida, y el solo camino adecuado para comprender los sistemas, biológicos, es la integración racional de la información obtenida a nivel molecular.

Para discutir el fenómeno de la integración pueden hacerse algunas consideraciones en relación con el todo y las partes que lo cons-

tituyen, de acuerdo con lo que sugieren las siguientes palabras de Eddington (27): «No cabe duda que nosotros podemos conocer el "uno" y estudiar completamente el "dos", pero "dos" es "uno" y "uno"; entonces nos preguntamos, ¿ cómo se puede estudiar la partícula copulativa "y"? Esta "y" es la base del conocimiento de la integración». La diferencia entre el todo y la suma de sus partes, consiste en el hecho de que en este último las partes están coordinadas en un orden definido. Para que se realice esta ordenación es preciso que entre las partes existan determinadas fuerzas que actúen para formar uniones de cierta consistencia. Sin ellas no existiría el todo: éstas son la "y" del aforismo de Eddington. El orden está subordinado al factor "fuerzas" y depende de su distribución espacial y sus propiedades específicas. El orden puede ser establecido solamente por la acción de las fuerzas intermoleculares, mientras que las fuerzas mismas no dependen directamente de la presencia de un orden determinado. Así, aparece la disposición conformacional del sistema y, debido al carácter cooperativo de muchas de aquéllas, el conjunto se coordina por ordenaciones topológicas y temporales, con efectos definidos para las propiedades del todo, resultando de este equilibrio de fuerzas y estructuras lo que podemos denominar «información integrativa».

El tipo de integración que se produce en un sistema biológico puede ser, a su vez, emergente o progresivo. El primero corresponde a numerosos fenómenos, que se conocen normalmente con el nombre de autoagregación. En estos casos, el todo se puede reducir a sus partes y éstas vuelven a integrarse de modo natural. Este tipo de integración corresponde al más bajo nivel organizativo, y entonces se puede decir que el orden emerge del desorden. Su organización depende sólo del contenido informativo existente en las partes. Es más simple que la integración progresiva realizada a niveles más altos, pero sus principios fundamentales son análogos. En la actualidad existen numerosos ejemplos de este tipo de integración, tales como la formación de proteínas de subunidades más simples: la autoformación de virus y fagos: la reconstitución de ribosomas, etc.

La otra clase de integración, de tipo progresivo, consiste en la inclusión de nuevos componentes en el todo ya preexistente. Por lo general, no es una integración de partes simples, sino de diversos

conjuntos para formar otros más complejos, en una subordinación jerárquica, que ha sido descrita por Koestler como un Jano bifronte. La cara que mira hacia el nivel más bajo es la de un todo autónomo, mientras que la que está dirigida al nivel superior es una parte dependiente de otras. La entidad más sencilla que puede formar un todo e integrarse en otro nivel, fue denominada «integrón por Jacob (28).

Las dos integraciones tienen una característica en común. Las fuerzas interactuantes son, en general, las mismas y se rigen por la condición de alcanzar al coordinarse valores mínimos de energía libre. En todo caso se produce un aumento del orden. Esto ha llevado a decir a Schrodinger que los sistemas biológicos son creadores de entropía negativa y Lwoff, en una reciente publicación, se ha permitido generalizar el concepto diciendo que «el orden es el combustible del que depende la vida» (29). Esto parece estar en contra del segundo principio de la Termodinámica, pero no hay que olvidar que la disminución de la energía libre, que tiende siempre a un mínimo, es en muchos casos mayor que el aumento de entropía negativa, que resulta del orden. De acuerdo con estas conclusiones, se presenta aquí una competición entre la energía libre y la entropía, problema del cual nos ocuparemos más adelante.

Los resultados obtenidos hasta el momento actual sólo permiten hablar del carácter fenomenológico del integracionismo. Se necesita un conocimiento mucho más profundo de las fuerzas intermoleculares de interacción, por lo cual el trabajo interdisciplinar y el intercambio de ideas, cada vez más amplio, entre investigadores de distintos sectores de la Ciencia es cada día de mayor importancia.

Esto es lo que se intenta realizar, en la actualidad, con la morfocinética (30), método de trabajo específicamente biofísico, que se ocupa de determinar la forma, el tamaño y la relación topográfica de los elementos estructurales de los sistemas biológicos -morfometría, estereología, etc.-, utilizando los resultados de las observaciones pertinentes, para abordar con claridad el desarrollo de la morfogénesis, su regulación externa e interna y los efectos de los procesos que en la misma están implicados. La Biofísica se ocupa fundamentalmente de estudiar la organización espacio-temporal de los seres vivos, inaccesible en general, a las ciencias clásicas, por razones técnicas y tecnológicas. La conexión cuantitativa entre los cambios topológicos y

temporales de un sistema, es la meta principal de la morfocinética, aunque ello esté limitado por la imposibilidad de medir la coordenada de posición y el impulso de cada uno de los elementos de un conjunto de manera simultánea. Sin embargo, se pueden obtener en la actualidad informaciones geométricas desarrolladas en el tiempo, de gran precisión y utilidad, para que, integradas en la cinética funcional, por medios cibernéticos, permitan establecer una concepción lógica de los sistemas biológicos considerados.

Es evidente que la integración es, por su propia naturaleza, una parte indivisible y complementaria del reduccionismo, dependiendo por completo del progreso de este último. Una combinación razonable de reduccionismo e integracionismo, parece ser la estrategia más adecuada para dirigir la actividad científica, futura, encaminada a desentrañar los secretos de la vida.

ORDEN FÍSICO Y ORDEN BIOLÓGICO

El orden considerado desde el punto de vista físico, es una propiedad que no se puede deducir solamente del conocimiento de las partículas elementales y sus interacciones. El concepto de orden en un cristal, por ejemplo, supone establecer una relación definida de los átomos en cada punto de la red cristalina, lo que a su vez implica una coordinación de elementos de simetría, que son concomitantes con la citada ordenación. En estas condiciones, se opera con correlaciones particulares entre distancias de determinados puntos de la red, que no pueden ser expresados más que considerando la situación de un número de átomos elevado.

Este aspecto del orden físico se refiere siempre a dos magnitudes complementarias, de acuerdo con los principios de la mecánica cuántica y teniendo en cuenta el principio de incertidumbre de Heisenberg, relativo a la exactitud de determinación de cada una de ellas. En termodinámica estadística, también se emplean dos parámetros: complementarios para definir el orden de un sistema, que, en general, son la posición en el espacio y su momento eléctrico o dipolar, pudiendo establecer, cuantitativamente, el grado de orden del mismo, referido, de una manera especial, a cada uno de ellos.

En los sistemas biológicos el concepto de orden no es sólo topológico, sino que también se refiere a algunos condicionamientos análogos a los que se presentan en las llamadas «artes del tiempo», en cuyas formas de creación se siguen, más o menos objetivamente, determinadas reglas de repetición y contraste, que pueden no alcanzar una representación visual, pero en cuya expresión los elementos del ritmo, o sea la reiteración de temas, figuras o sonidos es un hecho predominante (31). Esto ocurre en la música, la coreografía, la danza, la pintura o la poesía.

Por lo que respecta a la música, podríamos citar numerosos ejemplos que van desde el canto gregoriano a la música dodecafónica, pero como paradigmas de este aspecto que estamos considerando, indicaremos el bellísimo «concierto en re menor para dos violines y orquesta» de Bach, que constituye una de las obras más inspiradas de su genio musical. Pues bien, su preciadísima virtud, en frase de Fernández Cid, es «la de su equilibrio tan ordenado y preciso y la justeza de proporciones que da lugar a una espléndida expansión lírica dentro de una bien trabada estructura musical clásica». En esta obra, como en las sonatas de Bethowen o en los conciertos de Brahms «el juego contrapuntístico, siempre lógico y ordenado, es un modelo de armonía en que los sonidos y los temas se repiten, se persiguen como la sombra al cuerpo, juegan con su oponente, se funden, se hacen paralelos, alteran su ritmo o invierten su cadencia». En todo caso, es una elaboración exquisita de un arte, en el que la coordenada del tiempo, jugando con la simetría, es esencial y base de su fundamento. El valor de la simetría es perfectamente visible en las artes figurativas, como puede apreciarse tanto en los monumentos clásicos, como en las construcciones más modernas, en las cuales, aunque las reglas estéticas hayan sufrido modificaciones sustanciales, su validez está reforzada por necesidades técnicas de la propia estructura.

En la Física sólo en épocas recientes se ha reconocido un orden con respecto al momento eléctrico o dipolar, a su vez repetitivo y traslacional, que se ajusta, en esencia, a las premisas fundamentales de las artes del tiempo. Los esquemas derivados de este nuevo aspecto del orden físico tienen una evidente elegancia en su desarrollo pudiendo entonces preguntarnos como George Sarton: «¿ Las teorías que son más hermosas son más verdaderas ? Sea como fuere

son más sutiles y más fáciles de captar, y por ello vale la pena conocerles nuestra atención» (32).

En el orden cristalino se presenta una forma definitiva y rígida, la cual las interferencias locales se transmiten sólo de átomo a átomo en la estructura de la red, como en un sistema de conducción corriente. En cambio el concepto de ordenación, con relación a momentos eléctricos o magnéticos, es, según Mendelssohn (19), de carácter mucho más sutil, como corresponde al elevado rango de actuaciones de una correlación de fases. Este tipo de ordenación se puede conectar con las oscilaciones de las distintas formas moleculares simples, que, excitadas, se estabilizan por efectos no lineales y e pueden conducir a deformaciones o tensiones en el sistema. El concepto de los momentos condensados puede no ser una estructura ordenada en el espacio, pero las interferencias producidas no permanecen localizadas. Una perturbación que se produce en alguna parte del mismo se transmite inmediatamente a todo el espacio ocupado por él. Estamos, pues, en presencia de una ordenación de carácter rítmico o temporal.

En las estructuras vivas existen, según este autor, los dos tipos ordenaciones descritas, siendo muy difícil describir los sistemas biológicos en términos puros de cada una de ellas. Dichos sistemas presentan casi siempre propiedades de forma y simetría y en algunos casos hasta de rígida ordenación, pero la periodicidad en la cual está basado el orden cristalino, no existe en general. Hay que tener en cuenta una coordinación rítmica de las vibraciones de los electros, los átomos y las moléculas, y las correlaciones de fases correspondientes, que pueden ser de carácter repetitivo, cooperativo de ampliación alostérica. Esta mezcla en la cual se basa el orden biológico, llevó a Schrödinger a establecer lo que él llamó el «cristal aperiódico», que puede relacionarse con la forma del «cristal cerrado» de Monod y que, en ningún caso, se puede confundir con un cristal molecular de proteína, ya que este último conjunto no exhibe las propiedades de los seres vivos. Estos caracteres permanecen completamente ocultos en el modelo cristalino y, por consiguiente, es imposible deducir, «a priori», de su estado físico, si dichas unidades constituyentes del sistema, son capaces de producir vida o no.

Los momentos condensados en el conjunto viviente no son apa-

rentes más que en su potencia para acusar el impacto de las interferencias locales, que se pueden transmitir inmediatamente a toda su estructura. Una alteración local, que afecta a unos pocos átomos, puede cambiar o aniquilar por completo el aspecto esencial de la vida en toda su conformación. Así al separar el final de una cadena proteínica se puede originar una perturbación de este tipo, capaz de destruir el edificio conformacional que constituye el sistema biológicamente activo. Por el contrario, la supresión de la parte terminal de un cristal de cobre altera su longitud pero no toda su estructura.

Considerando el modelo colectivo expuesto por Mendelssohn y dado que no existen diferencias entre las propiedades de las partículas elementales que forman los objetos inanimados y los seres vivos, así como ocurre entre las que corresponden a un cristal molecular de proteína y un biopolímero, hay que suponer que lo que da realidad a los sistemas biológicos, debe de recaer en la especie de unión que se produce entre las unidades que forman dichos sistemas. Sin embargo, es muy difícil considerar que esto supone una significativa diferencia. La replicación en la doble hélice de las proteínas funcionales es un magnífico esquema representativo, pero poco convincente, si se deja limitado a considerarlo como un encaje esterequímico, basado en procesos de azar, que comprenden únicamente fuerzas de corto alcance. Tampoco parece aceptable asignar, tan sólo, la actividad biológica, a la capacidad de los conjuntos de presentar formas y desarrollos múltiples en sus estructuras y cadenas lineales e incluso que estos cambios concertados, entre cientos y miles de moléculas, puedan resultar simplemente de fuerzas de largo alcance. Sin embargo, y siguiendo las ideas de Mendelssohn, sí se podrían justificar los sistemas biológicos si se considerasen como conjuntos ordenados de un rango de correlación muy largo, centrado en los momentos eléctricos o energéticos condensados, en los cuales, una interferencia local se transmite a la totalidad de forma instantánea.

Combinando los dos principios de orden conocidos en la Física, se puede establecer la línea de separación entre los sistemas vivos e inanimados. En este esquema, las fuerzas de corto alcance y los principios de la esterequímica, en los que es preciso tener en cuenta la longitud de los enlaces con sus deformaciones, los ángulos de valencia y su distorsión y el alargamiento torsional o de Pitzer relacio-

nado con la barrera de potencial de la rotación interna (21), así como las simetrías moleculares o de grupo (33), y la conservación de la simetría orbital, en las reacciones concertadas (34), permiten establecer una conformación tal, que puede estar de acuerdo con las funciones que caracterizan a un determinado sistema biológico. Los procesos atribuibles a estos sistemas y que definen la vida, hay que situarlos así en las funciones de onda de los electrones que se extienden sobre todo el conjunto de la cadena y que operan sobre largas distancias en ella misma. En esta interpretación de Mendelssohn, la unidad básica de la vida tiene una naturaleza dual. Una molécula de proteína es una disposición de los átomos en el espacio en una estructura bien definida, pero para que ésta tenga coherencia, es decir, para que pueda presentar un propósito o proyecto común en el conjunto, o sea, una propiedad teleonómica, ha de compartir con otras el orden de largo alcance de su flujo electrónico. Ahora bien, esta tarea primordial de la vida nunca puede presentarse por sí misma y en solitario. El fluido electrónico requiere un «contenedor», que está formado por la propia estructura atómico-molecular del conjunto, la cual no puede alcanzar la conformación específica de su función más que a través de estados de resonancia. Así concibe Mendelssohn el mecanismo físico de los sistemas biológicos: como una combinación de dos procesos básicos de orden conocidos, que en la materia inanimada existen siempre separadamente.

Aunque este razonamiento nos parece bastante correcto, y en cierto modo ha sido trasladado a una expresión generalizada, en forma matemática, por Prigogine (35), incluyendo el flujo energético, veamos el problema desde el punto de vista de los conceptos hoy usuales en la Física electrónica, tal como se lo ha planteado Polonsky (36). En este campo interdisciplinar de la Ciencia se distinguen dos tipos de orden. Uno uniforme, repetitivo, de carácter termodinámico y otro de tipo informacional. Para aplicar estos conceptos a una estructura determinada hay que estudiarlos separadamente, porque sus efectos son diferentes.

La tasa de orden global de un sistema se puede expresar por su reluctancia, es decir, por la resistencia que opone el sistema para ser atravesado por un flujo magnético. En estas condiciones $R = 1 - H/H_{\max}$, donde H es la entropía del sistema en el estado conden-

sado y H_m la entropía máxima del conjunto, o sea, en un completo desorden. Cuando $H = 0$, $R = 1$ y el sistema está perfectamente ordenado. Por el contrario, siendo $H = H_m$, $R = 0$ y el sistema se encuentra en un total desorden. A su vez hay que considerar H/H_m representa la tasa de estructuras aleatorias, mientras que R expresa el porcentaje de correlaciones.

La entropía termodinámica negativa, corresponde a las correlaciones que se presentan repartidas uniformemente sobre todos los estados posibles o complexiones del sistema, que se expresan por una función de distribución estadística en la cual las partículas son indistinguibles, o sea, que se rigen por los modelos de Bose-Einstein o Fermi-Dirac. La estructura helicoidal o en doble hélice de una proteína, representa la contribución termodinámica y su efecto es reducir globalmente los efectos aleatorios en la molécula, lo que equivale a disminuir la temperatura estadística del sistema. Por otro lado, las correlaciones repartidas no uniformemente sobre los diferentes microestados del mismo, teniendo cada una su dirección y probabilidad propia, representa su entropía informacional negativa. Esto corresponde a las correlaciones específicas y diferenciales en el mensaje informativo, contenido en la secuencia lineal de las bases o ácidos aminados.

La contribución termodinámica se puede representar por un número que varía de 10 a 1; en cambio, la entropía informacional no puede representarse más que por medio de matrices de probabilidades de distribución o de transición, que juegan un papel muy importante en el conocimiento del sistema organizado. Es a través de tal matriz como se puede prever si el modelo funcional será unívoco o aleatorio.

TERMODINÁMICA DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

La energía

La complejidad de formas y funciones de los sistemas biológicos es, en sí misma, una clase de energía, de acuerdo con los principios de la Termodinámica. La organización que se presenta en los seres vivos es una cualidad positiva, que se puede asimilar a una informa-

ción, como la contenida en el código genético con una extraordinaria capacidad de improvisar modelos de conversión, análogos a los de los computadores o sistemas de comunicación elaborados por el hombre. De aquí el intento de asimilar aquéllos a un tipo de ingeniería bioquímica, que se conoce con el nombre de Biónica. Según la misma, el modelo biológico funciona como un ordenador electrónico, con un programa almacenado en estricto sentido matemático, modificable desde el exterior por efectos ecológicos. Este punto de vista ha llevado a considerar posible una teoría celular, que está ligada estrechamente a la electrónica y a la mecánica cuántica y en la que las macromoléculas son piezas o herramientas de un microproceso de datos, en un sistema de máxima miniaturización. Con ello se intenta dar una explicación satisfactoria a los procesos vitales, sometidos a una serie de condicionamientos físicos, expresables matemáticamente y que no son fáciles de comprender, si no se tienen en cuenta las ideas adquiridas en el estudio de las complejas máquinas pro-gramadas. Como postula Jordano Barea (37), si el trabajo celular está también programado en su totalidad, parece absolutamente ingenuo considerar que los movimientos de los mensajeros del ADN y los RNA, así como de los metabolitos protoplasmáticos, puedan actuar por un simple azar.

Asimismo, el conjunto de estructuras implicadas en el transporte electrónico es un concepto cuántico, como el indicado por Pullman y Pullman. en el que las macromoléculas funcionan como en circuitos transistorizados en parte, siendo la conformación general del sistema la que gobierna dicho transporte. Muchas de estas estructuras presentan una disposición triestratificada, que permite considerarlas, en su funcionamiento, como celdas de combustible que acumulan y transforman la energía química de los procesos metabólicos o como una serie de biópilas regidas por su propio programa conformacional cibernético (38).

Una de las más significativas conquistas de los tiempos modernos es el haber podido establecer que estas estructuras extremadamente elaboradas, que son esenciales para la actividad biológica y para cada función específica, no son más que el resultado lógico e inevitable de la aplicación a las mismas de los principios de la Termodinámica (39). Esto permite plantearse, en principio, sin resucitar un vitalismo de

nuevo cuño y sin apelar a ningún poder mágico, el estudio físico de los conjuntos colectivos biológicos desde un punto de vista energético, considerando que los mismos son sistemas abiertos e irreversibles, que existen en un estado dinámico de flujo continuo y para cuyo conocimiento, la coordenada del tiempo, la tasa de realización y las condiciones iniciales son elementos indispensables a considerar. Si las condiciones iniciales no fuesen dadas por la vida misma, ésta no existiría.

Las premisas que se imponen entonces al estudio de los sistemas biológicos, son la principal dificultad para trasladar los conceptos de la Física a la Biología, como indica el profesor Löwin (40), puesto que para los procesos dinámicos es preciso conocer mejor las condiciones iniciales y sobre todo las que presentan ya un cierto grado de orden. Por ejemplo, los problemas fundamentales del transporte, en los sistemas biológicos, se pueden tratar con cierta regularidad desde el punto de vista termodinámico, pero cuando se intenta penetrar en los conceptos desde la perspectiva general de la Física, se comprueba que ésta no trata demasiados fenómenos dependientes del tiempo, sino que se acostumbra a trabajar, en general, con estados estacionarios, aun en mecánica cuántica. Este problema, abordado por el profesor Prigogine (35), para el caso de los equilibrios, hace difícil comprender la teoría de la acción de los enzimas y de todos aquellos fenómenos que presentan una dependencia temporal. No obstante, los conocimientos actuales en procesos electrónicos y en bioenergética, así como en morfocinética, biónica y cibernética, permiten presuponer una acelerada carrera hacia el logro de los objetivos planteados, al hombre de nuestros días, por la revolución biológica.

Consideremos, por tanto, los sistemas biológicos desde el punto de vista energético.

En primer lugar, el flujo de energía biológica es irreversible. Ahora bien, la energía procedente del entorno no está enteramente termalizada, sino que se sitúa en forma de almacenamiento, para ser transformada en trabajo químico, osmótico o mecánico en el momento más oportuno y de la forma más eficiente. Se puede suponer que el almacenamiento de energía se produce en estructuras con dipolos eléctricos, con gran capacidad de excitación, que interaccionan con facilidad con los estados energéticos que sobre ellas inciden. Esta inter-

acción se puede explicar en una forma normal de absorción y emisión de energía, de acuerdo con las condiciones de Bohr y la probabilidad de transición de Einstein, que es proporcional al momento dipolar del sistema, lo que se acusa en una variación de frecuencia en los espectros característicos de la estructura que actúa de «contenedor». Parece que este sistema de osciladores, que puede suponerse que reciben una cantidad de energía en proporción constante, debieran de transmitir también energía en la misma proporción. Cuando el suministro de la misma es pequeño, las desviaciones son de escaso valor, pero trasapado un aporte crítico, se verifica un cambio cualitativo muy significativo y que es muy similar al llamado condensación de Einstein en un gas de Bose. La estructura conformacional puede variar, para aparecer con un estado de excitación mayor, siendo entonces la que presentará, aun en relación con la menor cantidad de suministro de energía, un contenido energético más elevado. Este fenómeno es análogo a una transición de fase térmica y está conectado con los efectos no lineales que aparecen en la fuerte excitación de un modelo simple y al proceso de estabilización de estas formas excitadas, que gobiernan, en su conjunto, la gran complejidad de su comportamiento (41).

El sistema biológico es así altamente dinámico y la liberación de energía está relacionada con la estructura del conjunto macromolecular que actúa en el almacenamiento y con su estado de vibración, que al elevar las tensiones y deformaciones no lineales, consecuentes al aporte energético, pueden conducir a nuevas fuerzas de interacción, con una extensa gama de correlaciones que hace posible visualizar procesos que están separados entre sí, tanto por el espacio como por el tiempo, como ocurre con la división celular. El proceso es, no obstante, bastante complejo. Sus posibilidades dependen de cada estructura específica. Dado el estado de los conocimientos actuales, puede, sin embargo, ser regulada por el cambio de excitación en el sistema de almacenaje. No es imposible construir un modelo dieléctrico experimental, que sea capaz de reproducir estos aspectos del flujo energético biológico. Para ello será necesario conocer con mucho más detalle las propiedades dieléctricas de los componentes del sistema, en unas regiones de frecuencia que hasta hace muy poco tiempo no eran accesibles a la experimentación (42).

Si existen oscilaciones de muy alta frecuencia en las estructuras biológicas, como ha revelado el profesor Careri (43), la bomba que contiene y distribuye la energía, variando su conformación e interacciones, puede considerarse formada por el ATP. El ADP será la forma no excitada y descargada de energía y el proceso es catalizado estereoespecíficamente por medios enzimáticos. Así el ATP es un transportador y convertidor de energía, a través de reacciones vectoriales relacionadas con la estructura conformacional y reacciones escalares no orientadas. Es importante señalar que se han podido realizar, recientemente, *lassers* químicos, donde el papel de la bomba ha sido sustituido por los fonones del calor desarrollado en una reacción.

En el sentido clásico de la Bioenergética podríamos decir, resumiendo, que los sistemas biológicos se mantienen en un estado de flujo continuo, que contiene un nivel muy bajo de entropía o desorden, comparado con el Universo que los rodea (39). Paradójicamente, en la evolución de los organismos vivos, a lo largo de millones de años, las diferentes especies tienden a ser más complejas, con lo cual parece que la entropía propia del mundo biológico tiene que disminuir de forma continua, contrariamente a lo previsto en el segundo principio de la Termodinámica. La estructura de la vida tiene por tanto una probabilidad estadística muy baja, y según Mendelssohn (44) es muy difícil que pueda aparecer como un proceso del azar. Más bien es una consecuencia para evadirse de los cambios físicos o químicos del entorno, de acuerdo con el simple principio de Le Chatelier-Braun. Puede suponerse, sin embargo, que se produce un descenso de entropía en los sistemas biológicos, compensado por el aumento de la misma en el mundo que los rodea. Así, en su totalidad, la entropía del Universo puede no decrecer. Los organismos vivos metabolizan moléculas complejas como glucósidos, lípidos o proteínas, de bajo contenido entrópico y, a través de procesos de oxidación, producen simples moléculas, como agua y anhídrido carbónico, de elevado contenido en entropía, que son eliminados al exterior. Por esta vía los organismos vivos mantienen su mínimo valor entrópico, causando una elevación del mismo en sus alrededores sin violar los principios generales de la Termodinámica.

La vida es por tanto, de acuerdo con estos conceptos, una constante lucha contra la tendencia a producir entropía, en los procesos

irreversibles que la caracterizan. La síntesis de macromoléculas de gran tamaño, altamente ordenadas y elaboradas para que contengan la máxima entropía negativa, o sea el mayor caudal de información y el desarrollo a través de complejas conformaciones de caracteres específicos que surgen como funciones propias del sistema: sus interacciones a larga y corta distancia, con el intercambio de flujos radiantes producidos por verdaderos osciladores electrónicos, estratégicamente situados, en una privilegiada red de circuitos transistorizados, son, en todo caso, poderosas fuerzas antientrópicas, pero, puesto que no es posible escapar al destino impuesto a todos los fenómenos de la Naturaleza. los sistemas biológico» escogen es menos dañino en este sentido. Producir entropía en un valor mínimo. Más adelante, veremos cómo este aspecto surge como una consecuencia de la Termodinámica generalizada de las situaciones que no están en equilibrio.

Energías de interacción molecular

En los apartados anteriores hemos mencionado reiteradamente las interacciones moleculares que, en su carácter energético, contribuyen de manera esencial a la conformación y estabilidad de los sistemas biológicos. Su conocimiento es cada día más importante en el estudio de las llamadas genéricamente por Pullman (45) «asociaciones moleculares», cuya característica principal es que en las mismas no se supone la formación de enlaces químicos fuertes y rígidos de tipo covalente que sólo existen en la estructura primaria de los biopolímeros. Estos se unen entre sí por fuerzas de interacción, que contribuyendo al ordenamiento preciso de las entidades biológicas supramoleculares (46), originan energías libres de estabilización, inferiores a las de los propios componentes individuales que las constituyen. Ello supone un aspecto mucho más dinámico y, por tanto, con una capacidad de modificación mucho mayor, por el efecto de acciones o perturbaciones externas, tanto de la estructura funcional formada como de la función o mecanismo específico que de la misma depende.

Estas fuerzas intermoleculares. mucho menos conocidas y menos precisas que las que están asociadas con los enlaces covalentes, son, por otra parte, de carácter débil, lo que las hace más laxas y flexibles.

En ciertos casos, sin embargo, alcanzan valores muy grandes debido a efectos cooperativos.

Con objeto de puntualizar el valor de cada una de las energías intermoleculares en la estabilidad y ordenación de las complejas asociaciones biológicas, expondremos algunas características importantes de las mismas separadamente.

1.º) El enlace de hidrógeno.

Las energías que se ponen en juego en los enlaces de hidrógeno son pequeñas, del orden de 3 a 9 Kcal, y la longitud del enlace oscila entre 2,5-3 Å. De ahí la gran influencia de la temperatura o la dilución en la disposición conformacional regida por este tipo de enlaces, que, en muchos casos, llega a romperse bruscamente, con un notable aumento de la distancia de los átomos enlazados.

Esta clase de enlace, juega un papel importante en aquellas reacciones que se efectúan a una temperatura en la cual se pueden producir con facilidad, como ocurre en las reacciones biológicas. Su existencia contribuye al mantenimiento de la disposición helicoidal de las proteínas, aunque su acción no sea la única y no se ha demostrado que se produzcan en la interacción lípidos-proteínas, ya que los primeros compuestos no poseen grupos funcionales dadores de protones. Cuando se imponen deformaciones al sistema se pueden obtener todas las distancias intermedias, pudiendo llegar en distorsiones de tipo angular a valores máximos.

La presencia del enlace de hidrógeno origina un desplazamiento de las frecuencias de vibración del con junto, en la región del infrarrojo o Raman. Su efecto en la configuración electrónica del sistema, es más importante cuando existen moléculas cuyas estructuras pueden presentar, entre sí, estados de resonancia. Este es el caso de los grupos amida, donde la disposición planar de los mismos y su pequeña longitud de enlace —C-N; 1,32 Å—, se supone debida a resonancias que se realizan en una proporción del 60 al 40 por 100. Su influencia en las cargas inducidas de los componentes asociados, es mucho más intensa cuando los grupos unidos por este enlace están dispuestos en cadena, como ocurre, por ejemplo, en los polipéptidos tipo α o β .

Esta acción del enlace de hidrógeno se puede estudiar a base de un tratamiento cuántico del mismo, en el que se tenga en cuenta, incluso, la correspondiente contribución de su parte covalente. Sin embargo, es más cómodo realizar este estudio a base de considerar el efecto cooperativo que se produce entre el dador y el aceptor, por ejemplo entre el grupo amida, que es el más polar, sobre los otros más cercanos que le rodean. Así, se puede hablar entonces de un estado electrónico en cadena, porque se trata más de una resonancia de carga cooperativa, que de una verdadera transferencia de la misma entre grupos unidos.

En consecuencia, los desplazamientos de las bandas del infrarrojo son más intensas, cuando la estructura electrónica de los grupos enlazados puede ser influida con facilidad por la variación de carga del enlace de hidrógeno y cuando la geometría molecular favorece los efectos cooperativos.

Así ocurre en las proteínas. debido al efecto resonante electrónico del grupo amida y a la peculiar geometría de la cadena polipeptídica, así como a la presencia de unos enlaces muy cortos con las moléculas de agua que las rodean. Entonces las proteínas aparecen como unos polipéptidos ordenados repetitivamente, con unas formas alargadas y flexibles, lo que supone unos desplazamientos de carga que se producen como en un estado líquido. Esto ha sido comprobado por las investigaciones realizadas con el ácido poli-D-glutámico, que se sabe tiene una configuración a comparándolo con su sal sódica, que es una estructura estadísticamente desordenada.

En resumen, el enlace de hidrógeno es el principal factor responsable de las propiedades dieléctricas de la cadena de un polipéptido, con acoplamiento de osciladores, en la frecuencia del infrarrojo. sobre todo en los grupos amida y por debajo de valores energéticos del orden de kT. Según Pullmann, más que transferencia de carga se produce una variación en la cantidad de electrones σ , que aumentan sobre los electrones, como se ha comprobado, por ejemplo, en los dos enlaces de la formamida. Esto explicaría a su vez la semiconductividad electrónica intrínseca de los polipéptidos, que es diferente a la semiconductividad extrínseca de los metales. Según Lowdin, el citado enlace es preciso considerarlo altamente flexible dependiendo su especial carácter, en cada caso, de la situación particular en que

se encuentre o del hecho de que el flujo de potencial, doble o simple de los protones, esté ligado fuertemente a las condiciones del entorno, dependiendo esto, a su vez, de la polarización de los electrones π o de efectos similares. Según este autor, para explicar algunos efectos biológicos desde el punto de vista del enlace de hidrógeno, se necesitaría, sin embargo, una nueva nomenclatura dinámica que todavía hoy aún no existe (40).

De los estudios realizados por diversos autores, se deduce que los enlaces por puente de hidrógeno son los que se producen entre las bases complementarias con un sustituyente en su nitrógeno glucosídico o en las proteínas, según la estructura de Watson-Crick, pero no entre las bases no complementarias. Este fenómeno parece inexplicable porque no existe ningún condicionamiento químico que se oponga a tal enlace. Por eso hay que pensar en que puede ser un impedimento conformacional, y que la unión por puente de hidrógeno pudiera realizarse, en otras circunstancias, incluso forzadas por factores exteriores. Esta posibilidad se ha observado en las interacciones codon-anticodon, o en la estructura de los ácidos ribonucleicos. Sin embargo, no se produce asociación alguna cuando se trata de bases libres.

Tenemos así indicadas un tipo de asociaciones preferenciales de tipo geométrico o conformacional. como las que se presentan en las interacciones verticales de las purinas y pirimidinas en solución acusa, fenómeno estudiado por Jardetzky (47) y otros autores (48) en las interacciones que se producen en los dinucleótidos, oligonucleótidos y polinucleótidos.

2.º) *Interacciones electrostáticas.*

Estas interacciones pueden presentarse entre cargas netas, con un valor energético de más de 5 Kcal/mol, o sea aproximadamente como un enlace de hidrógeno, pero con una longitud mayor, o sea unos 5-10 Å. En algunos fosfolípidos existen cargas negativas así como en las proteínas, pudiendo hallarse además en forma de zwitterion. Entre estas cargas netas se establecen interacciones locales, tanto en proteínas como entre lípidos y proteínas, pero no parece que su in-

fluencia sea muy importante, en el balance energético de la estabilidad de la estructura conformacional de las asociaciones moleculares.

3.º) *Fuerzas de polarización.*

Este tipo de interacciones, que pueden plantearse conjuntamente, corresponden a la capacidad de polarización inducida de los grupos que forman parte de los sistemas biológicos, por la acción de eléctricas netas o de momentos dipolares permanentes.

Contribuyen en escasa cuantía a la formación de asociaciones moleculares de interés biológico y se rompen con facilidad por la elevación de la temperatura. Su valor es del orden de 0,002 Kcal/mol para una distancia de 5 Å.

4.º) *Fuerzas de dispersión de London.*

Las llamadas fuerzas de dispersión de London son de tipo mecánico-cuántico y se deben a las interacciones entre los momentos dipolares transitorios, originados por las fluctuaciones de la densidad electrónica en las moléculas, y los momentos que los mismos inducen en las que se encuentran en su proximidad. Su valor energético es bastante grande, incluso superior al que corresponde al enlace de hidrógeno —8-16 Kcal/mol cuando las cadenas hidrocarbonadas son bastante largas, siendo muy sensibles a las menores variaciones de las distancias intermoleculares. Contribuyen en una proporción muy elevada a la estabilidad de los sistemas biológicos. A estas fuerzas, que se presentan entre moléculas apolares, habría que agregar las interacciones de polarización de Debye y las de orientación de Keesom para moléculas con grupos polares. Al conjunto de las mismas se les acostumbra a llamar fuerzas de van der Waals, sin hacer distinciones de su posible origen.

Los componentes electrostáticos y de polarización de estas fuerzas, se pueden calcular con una aproximación matemática, que corresponde al estudio de las interacciones dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido. Para efectuar este cálculo es preciso conocer los momentos dipolares, su localización direccional y la polarizabilidad de las moléculas que interaccionan. Para calcular las fuerzas de dispersión de

London, se necesitan conocer, además, los potenciales de ionización, que juegan asimismo un papel importante en el estudio de los complejos de transferencia de carga. Estas propiedades de los biopolímeros son muy difíciles de medir y a pesar del refinamiento actual de las técnicas de trabajo, no existe sobre la mayoría de ellos valores experimentales seguros.

Para paliar estos inconvenientes, Pullman y sus colaboradores han establecido un sistema de cálculo aproximado, que ha sido perfeccionado, más tarde, para poder tener una cierta representación cuantitativa de la intensidad de las fuerzas intermoleculares, en la formación de las asociaciones de interés biológico.

Para ello es preciso no utilizar la aproximación dipolo-dipolo, que no es apropiada ni justificable teóricamente, más que en el caso de las asociaciones entre purinas y pirimidinas, ya que las distancias que separan a los sistemas que interaccionan son muy superiores a sus dimensiones propias. Entonces se debe utilizar para el cálculo el tipo monopolar (45), en el cual se considera que las moléculas interaccionan con una carga neta total. Nash y Bradley (49), estudiaron, con esta aproximación, una distribución de cargas, suponiendo situadas en un mismo plano una molécula de uracilo y otra de adenina. Los resultados indican un mínimo de energía, como el que corresponde a un enlace por puente de hidrógeno. Esto es una confirmación explícita del carácter esencialmente electrostático de este tipo de enlace, como resultado de la distribución energética en la disposición general de los átomos aproximados en estas condiciones. Esto no podría explicarse en una concepción dipolar.

Los cálculos cuánticos realizados por Pullman y sus colaboradores, con aproximación monopolar, que se corresponden con los realizados por De Voe y Tinoco (50) con carácter dipolar, permiten sentar los siguientes principios. Las interacciones horizontales y las verticales contribuyen, de igual forma y en cantidad análoga, a la estabilidad de la estructura de la doble hélice. Las diferentes combinaciones de pares de bases se dividen desde el punto de vista de la energía de interacción en tres grupos. Las combinaciones más estables se establecen entre guanina y citosina las menos eficaces se originan entre la adenina y la timina, y tienen una estabilidad intermedia las que corresponden a las interacciones guanina-citosina y adenina-timina. Esto pone

de manifiesto el papel preponderante de las fuerzas de van der Waals. en la estabilidad de los ácidos nucleicos, con la evidencia de que su actuación se realiza lo mismo entre las bases asociadas en sentido horizontal, que en situación vertical. Ello demuestra el carácter irracional de las querellas sobre la diferente acción de las fuerzas debidas, al enlace de hidrógeno o las que originan el empaquetamiento. Son, fuerzas análogas, porque no teniendo el carácter preferente de los enlaces químicos, se ejercen con libertad en múltiples direcciones.

Otro ejemplo de confusión, citado por Pullmann, es lo impreciso de las ideas actuales sobre el papel que juegan los complejos de transferencia de carga en la determinación de las estructuras biológicas (51). El mal entendimiento de la teoría cinética de los citados complejos establecida por Mulliken, y el hecho de que Szent-Gyorgyi (52) hubiera indicado su posible existencia en los fenómenos bioquímicos, ha hecho que numerosos investigadores consideren el que aparezca una nueva banda de absorción en el espectro, como prueba de que se forman dichos complejos, atribuyendo una contribución considerable a estas fuerzas de transferencia de carga en su estabilidad. Este concepto es desde el punto de vista teórico gratuito y, con toda seguridad, completamente erróneo (53). Aunque, en algunos casos, dicha transferencia de carga puede existir, aunque sea en forma fraccionaria, por intercambio parcial de electrones, es evidente que las fuerzas de van der Waals tienen una influencia mucho mayor, en la estabilidad de los sistemas biológicos, que las de transferencia citadas.

5.º) *Interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas.*

Los sistemas biológicos existen siempre en medio acuoso. Es por tanto necesario considerar la presencia del agua en el conjunto y no dejar de contemplar la ordenación y estabilidad del mismo coordinado con estas moléculas. En muchos casos los biopolímeros son estables, tan sólo, en presencia de agua, como han indicado Sinaglou y colaboradores para el caso de la estructura helicoidal del ADN (54). En estas condiciones el factor más importante que gobierna las asociaciones moleculares para formar sistemas biológicos, son las fuerzas de interacción hidrofóbicas, que tienden a secuestrar los grupos de este carácter de la influencia del agua, originando interacciones

internas en «sitios» determinados o fuerzas intramoleculares, generalmente de tipo London, que, en estas condiciones, adquieren valores de consideración por situarse las moléculas a distancias muy cortas, debido al dispositivo asignado por el balance lipohidrofílico de las mismas. El disolvente contribuye así a una disminución entrópica muy grande. En todo caso se origina una conformación estructural adecuada, para que la molécula presente tan sólo sus grupos polares hacia la fase acuosa, con la que se coordina ordenadamente, produciéndose, en consecuencia, una forma de interacción hidrofílica muy acusada. Todo ello proporciona al conjunto una gran estabilidad, debido al bajo valor de energía libre en que se sitúa, como resultado de la disminución del área superficial expuesta al exterior, producida por un fuerte empaquetamiento molecular.

La estructura del agua en los sistemas biológicos, según estudios recientes de Cliford y colaboradores (55), puede presentarse en varias formas según convenga al mejor ordenamiento y estabilidad del conjunto. Por medidas de punto de congelación y espectros de R. M. N. del agua contenida en los capilares muy finos y en los poros de ciertos sistemas proteicos, se observa que su estructura no es la de este compuesto en su forma ordinaria. Existen menos enlaces de hidrógeno y sus moléculas tienen una gran movilidad, más característica de un gas que de un líquido. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, parece existir una estructura más rígida, de tipo clatrato (56), que se asemeja más a un sólido que a un líquido, aunque su punto de congelación sea mucho más bajo. En estas condiciones las moléculas de agua tienen un movimiento menos desordenado que en el agua ordinaria e, incluso, pueden adquirir una estructura análoga a la del hielo. Esta disposición contribuye, en la mayoría de los casos, interaccionando con los grupos polares de las moléculas biológicas, a la estabilidad y ordenación de estos sistemas, en función del propio balance termodinámico. El estudio experimental de estas situaciones es bastante difícil, pero presentan un interés especial para explicar los mecanismos fenomenológicos de las mismas.

Estructuras disipativas y orden biológico

En el desarrollo de los seres vivos, su metabolismo implica una larga serie de reacciones acopladas y concertadas, con múltiples sistemas de retro-alimentación. El resultado de coordinar todos estos procesos constituye un orden funcional, que es a veces muy difícil de expresar. En consecuencia, el orden biológico tiene que considerarse, en su totalidad, de carácter estructural y funcional. Por otra parte, a nivel celular o supracelular, esta ordenación se manifiesta en un conjunto de complejidad creciente, constituyendo, como ya hemos visto con anterioridad, un orden jerarquizado.

Ahora bien, cuando se desea establecer una explicación termodinámica correcta de la evolución organizativa de los sistemas biológicos, no basta con aplicar a los mismos los conceptos clásicos de la bioenergética, sino que es preciso incluirlos entre los estados abiertos, situados «fuera del equilibrio». Así como en un sistema cerrado, el equilibrio se produce cuando se alcanza una energía libre mínima, en relación, por ejemplo, con los productos que reaccionan y los que se producen en una reacción, en un sistema abierto y dinámico, alejado del equilibrio, éste está asociado a lo que se llaman procesos disipativos, establecidos como una idea surgida de la Termodinámica generalizada, en la cual no rigen los principios de orden de Boltzmann (57).

Aparecen entonces las «estructuras disipativas», que se refieren a un estado ordenado completamente diferente del clásico y que se puede llamar orden por fluctuaciones, análogo al establecido por Benard en el dominio de la hidrodinámica (58), donde, cuando un fluido se calienta por su parte inferior, se pasa, en determinadas condiciones, de un régimen que se rige por las ecuaciones ordinarias de conducción de calor, a otro diferente, en el cual, las corrientes de convección se mantienen a lo largo de todo el sistema. Esto supone un movimiento de masa, con una distribución de energía cinética a la totalidad del conjunto. En consecuencia, la energía térmica desordenada se convierte en energía mecánica, ordenada a largo alcance. Como estos fenómenos no funcionan en las condiciones de un ciclo, no se presenta ninguna contradicción con la segunda ley de la Termodinámica.

mica. El considerable flujo de calor, a lo largo de los gradientes de temperatura que existen entre los límites del sistema, indica la posibilidad de que se produzca en el mismo un proceso disipativo, que mantiene su interior en un estado de flujo de masa, separándola del equilibrio o hace retroceder la conducción de calor a un régimen estacionario. En todo caso, se produce una ordenación macroscópica, que corresponde a un elevado nivel cooperativo molecular.

En el año 1952, Turing (59) consideró que estos procesos disipativos se podían producir en las reacciones químicas acopladas con fenómenos de difusión de los reactivos y Prigogine (60) deduce, de sus estudios teóricos, que en una serie de reacciones con acoplamientos no lineales, $A \rightleftharpoons X_1 \rightleftharpoons X_2 \rightleftharpoons B$, se puede considerar la situación en un estado de flujo continuo, de los productos intermediarios X_1 y X_2 , con gradientes elevados de sus concentraciones, que contribuyen, así, a mantener la relación A/B, de no equilibrio, característica del proceso planteado. En estas condiciones, el sistema se presenta en un estado invariante, o de equilibrio consigo mismo, en el cual la entropía de la mezcla, es, de forma inusitada, bastante baja. Tenemos, por consiguiente, una situación ordenada que se mantiene por sí misma, a expensas de la disipación de la energía libre que se necesita para fijar la proporción A/B de no equilibrio, en la secuencia de la reacción.

Las estructuras disipativas pueden presentarse como estados de inestabilidad del sistema, que, situado fuera del equilibrio termodinámico, se ve sometido a determinadas fluctuaciones. Cuando estas fluctuaciones, térmicas, eléctricas, magnéticas, o energéticas en general, están por debajo de un determinado valor crítico, el sistema vuelve a su primitiva situación no perturbada. Por el contrario, por encima de este punto crítico, ciertas fluctuaciones se amplifican, formando un orden macroscópico, que se debe a una extensa perturbación, estabilizada por el intercambio de energía con el exterior. Debido a la estructura molecular del sistema, éste puede ser homogéneo macroscópicamente, pero no estar en las mismas condiciones a nivel molecular. Entonces las fluctuaciones conducen, inevitablemente, en una desviación de la entropía máxima.

En estos casos, la ecuación general de la entropía de un sistema fluctuante situado en condiciones cercanas al valor del equilibrio, S_0 ,

es, $S = S_0 + \delta S + 1/2\delta^2 S$. Como se está en los límites de un valor máximo, tendremos que $\delta S = 0$ y $\delta^2 S < 0$. Para que el estado de referencia, S_0 , sea estable, se necesita igualmente que el exceso de producción de entropía aumente con el tiempo, o sea, que $(d/d t)\delta^2 S > 0$, puesto que si no la fluctuación puede amplificarse, desviando al sistema del estado de referencia. Cuando nos encontramos bastante alejados del equilibrio termodinámico esta condición no se cumple y las expresiones anteriores dejan de ser válidas, evolucionando el sistema hacia un nuevo régimen de estructuras ordenadas. Además, si éste puede expresarse como un conjunto de equilibrios locales, entonces $(d/d t)\delta^2 S > 0$, como ha sido demostrado a través de cálculos referidos a modelos estocásticos. Esta situación queda así implicada en la descripción macroscópica usual de las situaciones ordenadas de no equilibrio y determinadas las condiciones límites, con independencia del estado de fluctuación momentáneo del sistema.

Para determinar el orden del mismo, se puede incorporar por tanto el efecto de las fluctuaciones, estudiando la evolución de $\delta^2 S$ no la de la entropía total, lo que permite distinguir cuándo dichas fluctuaciones retornan a un estado no perturbado o son amplificadas. Esto, hace posible establecer una mejor aproximación al problema de la estabilidad. La llamada función de Liapounoff, $(\delta^2 S)$, tiene así un significado muy definido en el orden total del estado macroscópico, pero además, su evolución en el tiempo, representa un aspecto físico muy importante, relacionado con la regresión o ampliación de las fluctuaciones. Cuando $(d/d t)\delta^2 S > 0$, el sistema es estable y por el contrario, es inestable si $(d/d t)\delta^2 S < 0$, para perturbaciones que estén en concordancia con las distintas ecuaciones cinéticas de cada una de las reacciones implicadas en la transformación, consideradas de forma independiente.

Estas condiciones se pueden expresar en función del intercambio de energía y materia con el exterior. En este caso $(d/d t)\delta^2 S = \sum \delta J_p \cdot \delta X_p$, siendo J_p los flujos de los fenómenos irreversibles, como la velocidad de una reacción química, o la difusión, etc., y X_p , las fuerzas correspondientes, que en el caso de las reacciones químicas se igualan a las afinidades y todo ello de acuerdo con la teoría de Onsanger, según la cual estos flujos y fuerzas corresponden a las

derivadas con respecto al tiempo de las variables de estado que se consideren. Se cumple además que: $J_1 = L_{11} X_1 + L_{12} X_2$ y $J_2 = L_{21} X_1 + L_{22} X_2$, donde L_{11} y L_{22} son los coeficientes fenomenológicos directos y L_{21} y L_{12} los coeficientes cruzados, siendo $L_{ij} = 0$, cuando no existe un acoplamiento en el proceso que establece que una fuerza X_1 sea capaz de producir un flujo. Así, una cantidad escalar, como la afinidad no puede producir un flujo de calor, electricidad o materia, puesto que éstos son factores vectoriales y menos simétricos que aquélla. Por la misma razón una fuerza vectorial, como un gradiente de temperatura, no puede producir la velocidad de una reacción. Cuando el espacio atravesado por el flujo es anisótropo, la afinidad no es necesariamente escalar. Por eso en la membrana celular puede existir un acoplamiento entre la velocidad de una reacción y el desplazamiento de los componentes, como ocurre en el transporte de iones Na^+ , acoplado con la hidrólisis del ATP.

Como la transición de un estado estable a otro inestable, se produce cuando $(d/dt) \delta^2 S = 0$, para una serie de reacciones químicas esto ocurrirá cuando se cumpla la siguiente ecuación: $d\alpha P = (d/dt) \delta^2 S = \sum \delta v_i \cdot \delta A_i = 0$, siendo v_i las velocidades de reacción y las afinidades $A_i = - \sum v_j \mu_j$, donde v_i son los coeficientes estequiométricos y μ_j , los potenciales químicos. La inestabilidad se produce por tanto, tan sólo, si al final de la transformación, un término de esta suma es negativo. Esto se origina por un proceso intermedio de tipo autocatalizador o de cruzamiento catalítico. En consecuencia, las inestabilidades se producen siempre fuera del equilibrio y en relaciones no lineales. Cuando $J_m = L_{21} X_e + L_{22} X_m = 0$ la producción de entropía es mínima y el estado alcanza entonces una situación de flujo continua.

Un caso especial a considerar es el que se refiere a la aparición de inestabilidades espaciales, que dependen de perturbaciones que conducen a estados topológicos no homogéneos. Estas inestabilidades, llamadas de «ruptura de simetría», permiten establecer una relación estrecha con las oscilaciones químicas, que aparecen en los sistemas de una termodinámica no lineal de procesos irreversibles (35).

Cuando el sistema no se encuentra muy alejado de la situación del equilibrio, se puede presentar un comportamiento periódico temporal, una ruptura espontánea de la homogeneidad espacial o aun fenóme-

nos más complejos. La aparición de estos fenómenos coherentes, exigen condiciones particulares, que han sido establecidas no sólo mediante cálculos aplicados a modelos teóricos, sino a reacciones químicas bien conocidas, como la de Zhabotinsky (61), correspondiente a la oxidación del ácido malónico por el bromato potásico en presencia de iones cerio. Para determinados valores de las concentraciones relativas entre Ce^{4+} y Ce^{3+} , se producen oscilaciones regulares, estableciéndose una estructura espacial que se mantiene durante bastante tiempo. Otras reacciones oscilantes han sido también perfectamente estudiadas, siendo su mecanismo conocido en sus detalles más importantes (62).

En los sistemas biológicos, las estructuras disipativas permiten establecer un orden oscilante, ya que sus procesos metabólicos al intercambiar energía y materia con el entorno funcionan como un sistema abierto. Por otra parte, los procesos vivientes, exigen la correlación de un gran número de reacciones químicas no lineales (catálisis enzimática, acomplamientos de activación o inhibición, autocatálisis directa, etc., y fenómenos de transporte que también presentan la misma condición). Asimismo los flujos de intercambio con el exterior, se relacionan en condiciones de no equilibrio, ya que, en la mayoría de los casos, los productos de las reacciones biológicas, son enviados, por el sistema, a lugares alejados del mismo para efectuar otras funciones.

Las oscilaciones no amortiguadas se pueden presentar, lo mismo alrededor de estados fijos estables, en cuyo caso, la parte real de la frecuencia debida a pequeñas perturbaciones desaparece, que en las cercanías de los estados inestables. Un ejemplo del primer supuesto es el clásico mecanismo Lotka-Valterra (63), donde las características de las oscilaciones dependen de las perturbaciones y éstas conducen a un cierto número de ciclos límites posibles.

Un punto importante que se deduce del estudio matemático de las condiciones termodinámicas de las estructuras disipativas, es que pequeñas fluctuaciones no pueden modificar las estructuras. Esto ocurre solamente si hay una variación en los parámetros del sistema, comparable a la diferencia entre dos situaciones estadísticamente posibles. Esta posibilidad optativa entre dos soluciones, aparece, por tanto, como un tipo primitivo de «información», que debe ser añadido a las-

leyes causales que determinan las futuras conformaciones. Cuando en las condiciones iniciales del sistema se alcanza una conducta periódica, análoga a las fluctuaciones, se produce un ciclo límite, con una organización espacial específica, constituyendo lo que se conoce con el nombre de «un cierre químico».

En general, las inestabilidades químicas, la ruptura de simetría y el cierre químico, pueden jugar un importante papel en la ordenación y estabilidad de los sistemas biológicos. La distinta estructuración espacial que debido a estos fenómenos se puede presentar, se caracteriza por el mantenimiento de determinados gradientes de potencial químico, de las sustancias que intervienen en las reacciones implicadas en los mismos. Dichos gradientes, pueden incluso modificar el estado físico-químico de otros compuestos, que no participan directamente en los procesos relacionados con la inestabilidad.

La extrapolación de las condiciones físico-químicas correspondientes a un equilibrio o próximas al mismo, no pueden explicar el comportamiento de los sistemas biológicos, mientras que, las condiciones de inestabilidad introducen rasgos esenciales que conducen a una nueva especie de orden estable. Las longitudes de onda características de los fenómenos oscilantes, que pueden originar una organización topológica y temporal, son del orden de 10^{-2} - 10^{-4} cm., lo que es muy amplio en relación con las dimensiones moleculares, por lo cual, el tratamiento macroscópico de ordenación está justificado. Así mismo, esto explica que las inestabilidades puedan conducir a mecanismos de amplificación, pasando, incluso, de un estado homogéneo hasta alcanzar una situación no homogénea. En todos los casos, en la escala molecular se puede seguir hablando de un equilibrio termo-dinámico local.

Determinadas reacciones enzimáticas importantes han sido estudiadas desde este punto de vista, en especial, el proceso de la glicólisis (64), en el cual se ha demostrado que las concentraciones de los constituyentes del sistema presentan un ritmo oscilante permanente, de período y amplitud constante, con ciclos límites estables en el tiempo, o sea, que la glicólisis es una estructura disipativa temporal. En la actualidad, se conocen otros muchos procesos de oscilaciones amortiguadas entre las reacciones metabólicas o la síntesis de determinadas proteínas, cuyo interés biológico es innegable.

Delmotte ha utilizado, recientemente, el concepto de las estructuras disipativas para plantearse un interesante modelo que explique cómo se amplifica la absorción de un fotón, por la sácula de un gránulo de cloroplasto. En esencia el problema se trata como un sistema fluctuante, que permite 'realizar la transición de un estado determinado de régimen invariante a otro diferente. En forma análoga, Changeux ha estudiado un modelo de estructuras disipativas, para comprender cómo se amplifica la información recibida por la membrana. A su vez, ciertas etapas de agregación celular pueden interpretarse como originadas por una acción enzimática, que funciona como una estructura disipativa espacial.

La síntesis abiótica de polipéptidos por condensación sobre superficies catalíticas, ha sido señalada por Katchalsky y col. (63) y Eigen (66), ha considerado también bajo estos supuestos, la evolución de un determinado número de biopolímeros situados colectivamente, en condiciones adecuadas, para que, a través de una serie sucesiva de inestabilidades, sean capaces de formar espontáneamente un «código genético».

Si se considera que la síntesis por replicación de los ácidos nucleicos, sobre molde previo, no es dominante en relación con el mecanismo de polimerización lineal, más que a partir de una distancia crítica del equilibrio, esto corresponde a una primera inestabilidad. Ahora bien, los procesos de replicación, pueden presentar «errores» que corresponden, en esencia, a un nuevo tipo de fluctuación. Entonces, podría presentarse la evolución de los sistemas biológicos como una serie de rupturas de inestabilidades, es decir, debida a la amplificación de las fluctuaciones, hasta que aparece un conjunto en el que predomina un tipo de macromoléculas estables, en relación con los posibles movimientos oscilantes originados por ellas mismas. En general se pasa así de la inestabilidad de lo homogéneo, a la estabilidad de lo heterogéneo, característico de la organización biológica progresiva.

La sucesión de inestabilidades en un sistema formado únicamente por proteínas, se prolonga indefinidamente: en cambio, la interacción entre proteínas y polinucleótidos conduce al sistema a un estado final estable originado por los errores en la cinética de replicación producida sobre el molde original, dando así lugar al código genético.

Se crea así una síntesis importante entre el punto de vista estático, estructuralista, clásico en la Biología molecular y el horizonte histórico que es característico de la Termodinámica. La entropía producida por unidad de masa y de tiempo, tomada como medida del metabolismo, aumenta en el primer período de los procesos biológicos, pasa por un máximo y disminuye para alcanzar finalmente el valor mínimo de un estado en régimen invariante. El primer período puede corresponder al umbral donde la inestabilidad del sistema ha sido alcanzada, y a través de las estructuras disipativas, constituir una cadena que conduce del equilibrio termodinámico clásico al orden biológico. En efecto, se puede hablar, con todo rigor, de un nuevo estado de materia inducida por un flujo de energía libre alejado del equilibrio. En este nuevo estado, rige una nueva química-física que corresponde a un nivel supramolecular, mientras que todas las leyes que se aplican al nivel de las moléculas permanecen esencialmente sin cambio, incluso el principio de orden de Boltzmann.

En consecuencia, los sistemas biológicos, según Eigen, lejos de tener que considerarlos como entidades especiales en lucha permanente contra el segundo principio de la Termodinámica, aparecen rigiéndose por las leyes físicas conocidas, pero con una flexibilidad especial, debida a su composición química, a las interacciones que entre sus moléculas pueden producirse y a los especiales planteamientos cinéticos que son aplicables a sus reacciones. La sucesión de inestabilidades intenta ser, por lo menos, una explicación coherente que permite establecer una línea de separación entre la materia inerte y los seres vivos. Las fluctuaciones que sitúan al sistema fuera del equilibrio son el elemento aleatorio, es decir el «azar»; la inestabilidad del medio y el hecho de que estas fluctuaciones vayan creciendo, representa la «necesidad». Así, el azar y la necesidad, indicados por Monod, no se oponen sino que se complementan y son consecuencias ineludibles de la Termodinámica de los procesos irreversibles, generalizada, con sus procesos y estructuras disipativas a los sistemas biológicos. Todo ello hace suponer a algunos autores, como Prigogine y Eigen, que los fundamentos de la vida pudieran ser así deducibles, con cierta lógica, a partir de los primeros principios.

ORDEN Y ESTABILIDAD EN LAS MEMBRANAS

Los sistemas que forman las membranas celulares, tienen una importancia básica en todos los fenómenos que en las mismas se desarrollan. Por eso, el conocimiento de su organización estructural es de suma importancia para valorar procesos de tanta trascendencia biológica, como su permeabilidad selectiva, el transporte activo o la regulación de los potenciales químicos, que permiten a la célula recibir y tratar múltiples informaciones, sin las cuales no se podría concebir, a la misma, como un organismo diferenciado de especial actividad concertada.

La organización de los componentes de la membrana celular depende de la naturaleza de las mismas y de las fases que en el sistema se puedan presentar. La singularidad básica de esta entidad biológica reside, fundamentalmente, en que el citoplasma, que forma una de las fases, es capaz de autorregulación y que su conformación varía de acuerdo con las necesidades vitales de la propia célula. Por ello en el estudio de la organización de las distintas membranas celulares, no es adecuado establecer un esquematismo analógico. La membrana no constituye un fin en sí misma; es un compromiso dinámico entre los imperativos de la supervivencia celular y las condiciones del entorno que la rodea (67).

Ahora bien, en cualquier caso ha sido muy útil el establecer unos modelos generalizados, que expliquen los hechos conocidos y prevean otras propiedades de este conjunto colectivo, dentro de los conceptos físico-químicos actuales.

En forma muy esquemática, se puede decir que las membranas celulares están formadas por lípidos, proteínas y agua. De acuerdo con las investigaciones más recientes parece que las proteínas de la membrana son muy abundantes en aminoácidos de carácter hidrófobo, que los lípidos están formados especialmente por fosfolípidos y esteroles y que el agua juega un papel de suma importancia en su organización.

Las fuerzas que contribuyen al orden y estabilidad dinámica de la membrana son las de tipo hidrofóbico, las de dispersión de London y las de interacción electrostática y dipolar. Debido a la gran diversidad estructural de las proteínas, el elevado polimorfismo de

los lípidos y su facilidad para establecer entre ellos y a través del medio acuoso ordenador múltiples fuerzas de interacción, se pueden presentar conformaciones totales muy variables, con energías libres mínimas casi equivalentes y con una asimetría procedente de las mismas condiciones de los componentes. Las fluctuaciones que en dichos estados se pueden originar por flujos de materia y energía o por interacción de momentos eléctricos o magnéticos, modifican las sutiles fuerzas de interacción, dando lugar a oscilaciones periódicas temporales, que, creando estructuras disipativas, sitúan al conjunto colectivo de la membrana como un sistema regido por los principios de la termodinámica de no-equilibrio.

El primer intento de establecer un modelo ordenado en la membrana se debe a Gorter y Grendel (68), quienes conciben la existencia, en los glóbulos rojos, de una doble capa de lípidos ordenados paralelamente, con sus grupos polares situados tanto hacia el medio acuoso exterior como hacia el del interior, quedando secuestrados dentro de esa bicapa los grupos hidrófobos de las cadenas lipídicas. Esta estructura ha sido confirmada por la disposición que adoptan los lípidos puros al ser dispersados en el agua.

Este sistema de ordenación llevó, a Danielli y Davson (69), a considerar la membrana formada por una bicapa de moléculas lipídicas, intercaladas entre unos sistemas laminares proteínicos, que forman tanto su parte externa como interna, unidos por interacciones electrostáticas con los grupos polares de los lípidos y en contacto con el agua. Este modelo trilaminar, es termodinámicamente inestable, no sólo porque los aminoácidos de las proteínas de la membrana están expuestos en gran extensión hacia el medio acuoso, sino porque los grupos iónicos y polares del lípido está así separados del contacto del agua por una capa de proteína. Por consiguiente, ni las interacciones hidrofóbicas ni las hidrofílicas adquieren, en este caso, su valor máximo. Por otra parte, la penetración de los iones y moléculas, solubles en el agua, a través de la barrera lipídica, así establecida, es de difícil explicación. Ello ha hecho pensar en una especie de invaginación de las monocapas de proteína, a través de la bicapa, constituyendo una fase, de carácter más o menos hidrófila, por donde se pueda realizar el paso de aquellas especies moleculares.

Sin embargo, el citado esquema fue generalizado posteriormente por Robertson (70), estableciendo el modelo llamado de «unidad de membrana», por considerar que la estructura en doble capa lipídica es común a todos los sistemas biológicos. Este tipo de membrana ha sido comprobado por el mismo Robertson (71), mediante observaciones al microscopio electrónico sobre cortes de células, y por Finean y colaboradores (72) por estudios de difracción de rayos X, en bajo ángulo de incidencia, sobre membranas de eritrocitos. Asimismo, Pethica (73) indica que los cálculos de las energías de estabilización de una capa doble de fosfolípidos corresponde a un valor máximo, lo que es termodinámicamente correcto, ya que la cohesión lateral resulta del carácter anfófilo del conjunto. A pesar de todo es difícil imaginar la membrana en esta forma estática, puesto que, aparte la rigidez estructural de algunos sistemas especializados, como el de la mielina, hoy no se puede descartar el aspecto dinámico de dichas estructuras y su relación funcional fenomenológica. Además este modelo no está de acuerdo, según Lenard y col. (74), con los conocimientos actuales de las estructuras de las proteínas y otras macromoléculas.

Ya Kavanau (75) postulaba una disposición muy flexible en estos sistemas, indicando que las diferentes estructuras observadas en el microscopio electrónico no son más que instantáneas de un momento de su actividad funcional, con lo cual se intentaban conciliar los aspectos de la doble capa lipídica o de micelas globulares, como una situación de equilibrio dinámico que estuviera controlado por la célula misma.

Para tratar de valorar el papel de las proteínas en la estabilización de la membrana, tenemos que distinguir, en forma muy general, dos tipos de estos compuestos: a) proteínas periféricas, que requieren solamente tratamientos suaves, como un incremento en la fuerza iónica del medio, o la adición de un agente quelante, para separar sus moléculas intactas de la misma; se obtienen libres de lípidos y, en estado disociado, son relativamente solubles en buffers acuosos neutros. Esto sugiere que las proteínas periféricas están unidas solamente por interacciones no covalentes (seguramente de tipo electrostático) y además que su asociación con los lípidos no es demasiado intensa, como ocurre en el citocromo o la espectrina de los eritrocitos, y b)

proteínas integrales que requieren tratamientos mucho más drásticos, como la actuación de detergentes, ácidos biliares, proteínas desnaturalizadas o disolventes orgánicos, para eliminarlas de las membranas. En muchos casos, permanecen asociadas con los lípidos cuando se aíslan, y si se liberan por completo de ellos, son, por lo general, muy insolubles o forman agregados en buffers acuosos neutros.

Las proteínas integrales son las de mayor interés para determinar la estructura de la membrana. Las propiedades e interacciones de las proteínas periféricas, aunque son muy importantes desde el punto de vista funcional, no tienen tanta trascendencia en la problemática estructural de la misma.

Las proteínas integrales se considera que están dispuestas en forma globular, con un contenido menor del 40 por 100 de conformación α hélice, mejor que extendidas en monocapas. Sin embargo, un modelo de membrana en el cual tales proteínas globulares estuvieran dispuestas en la superficie exterior de una bicapa lipídica, no es satisfactorio, entre otras razones, porque así el espesor de la misma sería mucho mayor que el que corresponde a los 75 ó 90 Å observados, en general. Un sistema en el cual las proteínas globulares estén intercaladas en la fase lipídica es mucho más correcto.

Los razonamientos indicados y la aparición de un aspecto granular en la observación al microscopio electrónico de algunas membranas, hizo postular a Lucy (76) que ésta pudiera estar constituida por sub unidades globulares lipídicas, orientadas, radialmente, con sus cadenas hidrofóbicas hacia el interior y los grupos polares en la superficie, formando una película, casi continua, de corpúsculos micelares, de 40 Å de diámetro. Entre éstos estaban situadas las proteínas y glicoproteínas, originándose unos poros de alrededor de 4 Å, que atraviesan el espesor de la membrana y que explican la permeabilidad de la misma. así como el transporte activo. En el modelo de Sjostrand (77) las micelas no están formadas tan sólo de lípidos. sino constituidas por un complejo lipoproteico. Esto pudiera estar de acuerdo con el carácter funcional asignado a estas asociaciones, como se deduce de muchos resultados experimentales.

En contraposición al modelo de membrana de Lucy, que atribuye el papel fundamental en la ordenación estructural a la fase lipídica. Benson (78) se la asigna a las proteínas y al agua, como ya había

apuntado Sjöstrand, al destacar la importancia de las regiones hidrofobas de las lipoproteínas y el aspecto de la coordinación del agua, en relación con los grupos polares de los componentes del sistema. Recientemente, este mismo autor (79) ha sugerido que la estructura de la membrana celular puede ser visualizada, al microscopio electrónico, como un agregado bidimensional de subunidades lipoproteicas.

Esta concepción estructural, así como las observaciones de Green (80) acerca de las subunidades lipoproteicas y de su forma de unirse para constituir dicho sistema biológico, han sido rechazadas por Stoeckenius y Engelman (81), que consideran que la reagrupación del material solubilizado de las membranas, no produce la formación de estructuras poliédricas o helicoidales, como 'podría esperarse si se partiera de elementos unitarios idénticos.

Después de realizar un análisis minucioso de los datos experimentales conocidos hasta la fecha, y por consideraciones termodinámicas, Singer (82) ha postulado lo que denomina «modelo de mosaico fluido». En este esquema, las proteínas que están integradas en la membrana, son agregados globulares, cualitativamente heterogéneos, ordenados en una estructura anfifílica, con los grupos iónicos y polares proyectándose hacia la fase acuosa y los grupos no polares sumergidos. en toda su amplitud, en el interior hidrofóbico de la misma (83). Estos agregados globulares proteicos están situados sobre una matriz lipídica, organizada en forma de bicapa, discontinua y fluida, aunque una pequeña fracción de los lípidos pueda interactuar, de forma específica, con las proteínas, para formar algún complejo lipoproteico. En todo el conjunto existe un control termodinámico, por el cual, la conformación de la estructura, en su totalidad, está determinada por la secuencia de los aminoácidos, las uniones covalentes de las proteínas, y sus interacciones con el entorno, de tal forma, que la energía libre del sistema sea la mínima. Algunas moléculas de proteína integral, con un tamaño y estructura apropiada, producen agregados de las mismas, o un sistema lipoproteico, que puede atravesar la membrana, es decir, que es posible que existan regiones de proteína en contacto con el disolvente acuoso, en ambos lados de aquélla.

Si en el «modelo de mosaico fluido», propuesto por Singer, la

matriz es de tipo lipídico, se producen inevitablemente determinadas consecuencias, que son de gran importancia para explicar los fenómenos biológicos que este sistema presenta (84).

En general, no se deben de producir ordenaciones de largo alcance, es decir, con grandes espaciados, como para influir en la distribución de las moléculas proteicas, debiendo de estar éstas, por tanto, dispersadas, en una disposición aperiódica, en la superficie de la membrana. La ausencia de ordenaciones de largo alcance en la misma, no debe hacernos suponer que no existan ordenaciones de corto alcance. Estos sistemas ordenados existen, por ejemplo, en algunos componentes de las cadenas capaces de transportar electrones en el conjunto mitocondrial interno, y se deben, en la mayoría de los casos, a interacciones entre proteínas específicas o a lipoproteínas, que dan lugar a la formación de agregados esteoquímicos, definidos. En una membrana tipo mosaico, con matriz lipídica, la distribución de tales agregados, en un espacio de largo alcance, debe de esperarse que esté dispuesta al azar sobre la superficie total. En casos especiales, como por ejemplo en la sinapsis, hay que suponer o que las interacciones específicas de corto alcance producen un voluminoso agregado bidimensional o que algún agente extrínseco interacciona, en forma cooperativa, con dichas proteínas integrales específicas, para reducir su situación en un área superficial limitada. En otras palabras, Singer sugiere que las agregaciones proteicas, consideradas al azar en largas distancias, son la norma en la membrana; cuando se presentan distribuciones con una cierta ordenación, deben de existir algunos mecanismos responsables de este estado.

En el modelo que estamos considerando, y bajo condiciones fisiológicas, los lípidos están en un estado fluido, por lo general del tipo llamado líquido cristalino, como se ha comprobado en diversos estudios experimentales. Entonces se pueden preveer algunas características de sus funciones, como la transmisión de impulsos nerviosos, el transporte de electrolitos a su través, el efecto de drogas y hormonas específicas, los fenómenos cooperativos y la asimetría de dicho sistema biológico.

Las perturbaciones físicas o químicas que afecten a una membrana, pueden alterar la disposición estructural de alguno de sus compo-

nentes o agregados. Entonces se presenta una redistribución de los mismos, por difusión traslacional, a través de la solución viscosa, propia de este sistema, el cual, por medio de interacciones específicas, se vuelve a situar en condiciones termodinámicas de la máxima estabilidad. Este mecanismo general ocurre en unos intervalos de tiempo muy pequeños, capaces de explicar, por ejemplo, los efectos producidos en los linfocitos por la acción de los anticuerpos, que, atacando directamente a las moléculas de inoglobulina, producen una nueva disposición de las mismas en la superficie.

Muchas experiencias han puesto de manifiesto que las dos caras de la membrana no son idénticas en composición o estructura. Un aspecto de esta asimetría es la distribución en las mismas de los oligosacáridos. Determinadas proteínas vegetales o diversas aglutininas se pueden unir a los residuos específicos del azúcar, produciendo la aglutinación de las células (84). Conjugando varias aglutininas con la ferritina, ha sido posible visualizar, por microscopía electrónica, la distribución de los oligosacáridos, observándose que, en algunos casos, se ataca precisamente la cara externa del eritrocito y no la superficie interna citoplasmática (85). La ausencia de oligosacáridos, en dicha cara interna, podría indicar que la transición rotacional de la glicoproteína del eritrocito, desde la parte de fuera, al interior de las membranas, es prácticamente despreciable. Si las proteínas integrales, incluyendo las glicoproteínas, presentan como los fosfolípidos, una estructura anfifílica, se necesita una gran cantidad de energía libre de activación para hacer rotar las regiones polares o iónicas de las mismas, a través del interior hidrofóbico de la membrana, dificultando, en grado sumo, su paso de una a otra superficie. De acuerdo con el modelo de mosaico fluido, estas conclusiones, que se refieren a la asimetría, indican que la difusión traslacional en dos dimensiones de las proteínas integrales y los fosfolípidos ocurren libremente, mientras que la difusión rotacional de estos componentes está restringida, por lo general, a los ejes perpendiculares al plano de la membrana, y cuando se produce dicho giro es a una velocidad no ciertamente significativa, por lo cual exige un cierto tiempo para ponerse de manifiesto.

En algunas condiciones, el proceso perturbador, que se inicia en, un sitio correspondiente a una estructura compleja de la superficie,

se transmite a otro situado a bastante distancia, debido a un fenómeno cooperativo. Este puede ser de tipo trans, que se refiere a un cambio alostérico, como el que se postula que se origina en una región localizada en la superficie de la membrana, transmitiéndose su efecto de una cara a la otra. Así por ejemplo, una proteína integral puede existir en la misma como un agregado de dos o más subunidades, estando expuesto a la solución acuosa por la cara externa y al citoplasma por la parte interna. La unión específica de una droga u hormona, en un sitio activo de la subunidad orientada hacia afuera, puede inducir a un reagrupamiento conformacional en el agregado y por consiguiente a un cambio en las propiedades funcionales del mismo, en la parte que está orientada hacia el interior (86).

El efecto cooperativo llamado cis, se produce en la superficie de la membrana entera, o en grandes áreas de la misma, como consecuencia de algunos procesos que ocurren en un solo punto o en unos pocos bien diferenciados, que originan su transmisión y amplificación, al modificarse las interacciones estructurales, como sucede, por ejemplo, con los efectos destructivos de ciertos bactericidas, la lisis de las células del huevo después de su fertilización y las interacciones de hormonas del crecimiento con membranas de eritrocitos (87).

El modelo alostérico de Monod-Wyman, ha sido adoptado por Changeux y sus colaboradores (88), para explicar los procesos cooperativos proteicos de las membranas. Según este autor las subunidades individuales pueden existir en uno o dos estados de conformación, uno de los cuales, llamado normal, tiene mucha mayor facilidad de enlace para un ligando específico que el otro. Si la proteína integral está dispersa monomolecularmente en la membrana, la conformación promovida por la unión con el ligando, origina una agregación, que debe de presentarse en el estado termodinámicamente más estable. Para ello, y poniendo en juego las interacciones correspondientes se produce una difusión de las proteínas que no tienen carácter ligante hacia el complejo formado, produciéndose, en consecuencia, un cambio simultáneo en la conformación de todos los agregados proteicos. Este mecanismo, de tipo cis, puede ser de largo alcance, si se origina una estructura espacial de tamaño suficiente y si la misma puede producir perturbaciones locales ade-

cuadas. Esta transición ocurre a una velocidad, que se corresponde con la difusión de las moléculas de la proteína integral en el modelo de mosaico fluido, que es del orden de unos minutos, lo que contrasta con la vida media de la transformación conformacional de una proteína soluble alostérica, como la aspartiltranscarbamilasa, que tiene un valor de 10 milisegundos. Sin embargo, las variaciones de fluorescencia producidas por la interacción de la colicina con el *Escherichia coli* que se consideran transiciones cooperativas de tipo cis, transcurren en intervalos de varios minutos. Si este mecanismo sugerido para el efecto de la colicina es válido, se puede predecir que los experimentos de congelación en bacterias tratadas en circunstancias análogas, deben de revelar una agregación de partículas, que, normalmente, están dispersadas en la cara interna de la membrana, o presentarse variaciones en el estado fluido de la misma, como el que se produce por alteraciones en su composición lipídica o por la temperatura, factores que afectan de una manera muy destacada a la cinética de las transiciones fluorescentes.

LOS LÍPIDOS EN LA ORDENACIÓN DE LA MEMBRANA

Durante mucho tiempo se ha considerado que el único objetivo de la presencia de los lípidos en la membrana era formar una barrera hidrofóbica con el exterior. Sin embargo, los compuestos lipídicos que se han aislado de diversos tipos de membrana, demuestran que en su conjunto, existe una compleja distribución de grupos polares y cadenas hidrocarbonadas, lo que facilita la posibilidad de que se formen estructuras muy diversas en sus interacciones, y que los sistemas lípido-agua estén asociados con algunas de las propiedades funcionales de aquéllas (89).

De acuerdo con los estudios de Dervichian, Ekwall, Winsor, Luzatti y Chapman (90), los lípidos se pueden presentar en diversas fases que exhiben una organización altamente ordenada a gran alcance y cuya estructura puede clasificarse de acuerdo con criterios formales cristalográficos, pero que es mejor reducir, por razones intuitivas, a los grupos de mesomorfismo liotrópico siguientes:

- 1.º) fases laminares, en las que las cadenas hidrocarbonada, están

situadas como hojas o lamelas cubiertas a ambos lados por los grupos polares. Dichas lamelas pueden ser infinitamente planas y agrupadas en redes unidimensionales, como en un estado esméctico. A su vez, los elementos estructurales que forman las lamelas, pueden organizarse en redes bidimensionales de cintas de longitud infinita o como discos coordinados en retículos tridimensionales. En general, las lamelas, cualquiera que sea su condición, son equidistantes, y

2.º) las de tipo varilla, infinitamente largas o de longitud finita, empaquetadas en una red bidimensional hexagonal, con los grupos polares en el exterior y los radicales hidrófobos en el interior de los cilindros. Si las varillas son de longitud finita, se pueden agrupar de tres en tres, en redes bidimensionales, hexagonales o cuadradas, que pueden interaccionar entre sí formando retículos tridimensionales entrelazados.

Los fosfolípidos, incluidos los saturados, presentan en estado sólido y a bajas temperaturas, sus cadenas alifáticas en una configuración transplanar, con ligeras oscilaciones torsionales, como se deduce de sus espectros infrarrojos y de RMN. Cuando en dichos compuestos se va elevando la temperatura, se aumenta el movimiento molecular, llegando a alcanzarse, en el punto de transición, un cambio endotérmico muy acusado, en el que las cadenas hidrocarbonadas «funden» y se produce una rotura de la disposición planar, con una completa flexibilidad y amplitud de oscilaciones y rotaciones. Se reducen así las distancias entre los finales de las cadenas y, en consecuencia, los espaciados de rayos X, llegando incluso a originarse difusiones laterales de las moléculas lipídicas, que, como los movimientos de las mismas, son de tipo cooperativo.

Por debajo de la temperatura de transición, el agua no puede penetrar en la red formada por los grupos polares, pero a partir de la misma, los lípidos se hinchan, produciéndose espontáneamente figuras de mielina, observables perfectamente al microscopio. Cuando el agua ha penetrado en la red estructural de los lípidos y éstos se enfrían después por debajo del punto de Kraft, aquélla no se expulsa del conjunto, quedando entonces las cadenas hidrocarbonadas con una ordenación casi total. Se considera que parte del agua añadida, se coordina con los grupos polares de los fosfolípidos, en un estado especial que no congela a la temperatura de 0°. Se alteran así las

propiedades de transporte y difusión a través de la membrana, sobre todo cuando en el medio acuoso existen moléculas, iones o drogas activas biológicamente. Esta disposición estructural corresponde al estado macroscópico de un gel. La fase laminar, que se presenta por encima del punto de Kraft, es análoga, pero con las cadenas hidrocarbonadas fundidas y dotadas de una gran movilidad, formando una fase de tipo líquido cristalino. En general, el agua causa una reducción de las fuerzas London-van der Waals, entre las cadenas alifáticas, y las temperaturas de transición son más bajas en la medida en que se presentan más dobles enlaces.

Cuando existen grupos ionizados, éstos se pueden repelen por su polaridad. Si la carga neta por grupo polar, es equivalente a le , se originan cilindros con más facilidad que agrupaciones esféricas. Estas se producen con cargas mayores que $2e$ por grupo y entre $0-1,25e$ la disposición es generalmente laminar. Si el grupo polar está dispuesto en una sección cruzada con la cadena hidrocarbonada, la máxima energía de interacción, da lugar a que dichos grupos aparezcan en forma curvada, como corresponde a una fase hexagonal o esférica.

En las multicapas de lecitina estudiadas por Levine (91), mediante la técnica de difracción de rayos X, se demuestra que con un por 100 de agua, los grupos finales de las cadenas hidrocarbonadas, están localizados casi en el centro de la bicapa. A estas mismas consecuencias han llegado Jost y col. (92), trabajando con espectroscopía de spin marcado, observando una elevada anisotropía, que corresponde a una secuencia rotacional de 10^8 cps. A su vez la libertad de movimiento en las cadenas de los ácidos grasos, aumentan con la separación de los grupos metileno de los enlaces tipo éster, sobre todo, a partir de una distancia aproximada de 4-8 C-C, siendo mayor en los compuestos olefícos o con dobles enlaces. En general, se puede decir que éstos causan una expansión en el área de las cadenas correspondientes. Los grupos polares están restringidos en su movimiento por la ordenación del agua en su entorno (93). En general, se consideran necesarias 10 moléculas de agua para coordinarse, por ejemplo, con cada grupo de lecitina. De éstas, cuatro o cinco se utilizan para una hidratación primaria, con uniones más fuertes que las restantes.

Por otra parte, los datos calorimétricos obtenidos operando con

lípidos de importancia biológica, permiten confirmar la naturaleza cooperativa de la transición del estado de gel al de líquido cristalino. Trauble (94) indica que el tiempo de relajación del cambio conformacional citado, oscila entre 100 y 1200 segundos y que existe un máximo cuando el porcentaje de transición es 0,8. Cuando la longitud de las cadenas de los fosfolípidos aumenta, el factor cooperativo de la transición se hace mayor. También se ha observado, por spin marcado, que por encima de la temperatura de transición, las moléculas de los lípidos presentan una difusión lateral en el plano de la membrana. El coeficiente de difusión es de 10^{-8} cm²/seg., lo que corresponde a un desplazamiento de alrededor de 10.000 Å en un segundo. La transición de fases, ejerce una gran influencia en el proceso de la difusión (95).

Las investigaciones más recientes (96), han establecido una evidente relación entre los estados condensados y expandidos de las monocapas de los lípidos, sus estados mesomórficos y las transiciones conformacionales de tipo gel a estado líquido cristalino, que pueden presentarse en la membrana, lo cual ha supuesto que esta técnica haya alcanzado, en estos últimos años, un manifiesto desarrollo y aplicación, debido a que los trabajos realizados en estas condiciones, se refieren a sustancias lipídicas que no han sido perturbadas por ningún agente externo.

Nuestros trabajos efectuados con monocapas de diversos ácidos grasos (97), nos han permitido trazar con toda exactitud sus isothermas de compresión, determinando las áreas moleculares que corresponden a los puntos de transición indicados y a los diferentes equilibrios de fase que en las mismas se pueden presentar, explicándolos de acuerdo con la conformación de las moléculas y en relación con la estructura de las mismas en estado tridimensional, aclarando puntos oscuros y problemas de interés, que, en las fechas de nuestras investigaciones, no eran suficientemente conocidos.

En general, se puede decir, que la acidez del sustrato rebaja la presión superficial del film monomolecular, ya que al disminuir la disociación del ácido graso, el número de partículas por unidad de superficie decrece. Se llega al mismo resultado, si tan sólo consideramos las interacciones eléctricas, también disminuidas por la acidez de la capa subyacente. El cambio de fase no aparece hasta que la

superficie molecular se reduce a 25 \AA^2 mol, en cuyo momento se pasa a un estado condensado. El área de base molecular, extrapolada, es de $19,95 \text{ \AA}^2$ mol para el ácido esteárico y $20,8 \text{ \AA}^2$ mol para el palmítico en concordancia con valores obtenidos muy recientemente (98). El comienzo de la fase condensada corresponde al enderezamiento total de las cadenas del ácido graso, y el área de; base molecular, a su disposición vertical, pero sin comprimir, y por tanto, con posibilidades de un movimiento de rotación. El valor teórico calculado, suponiendo la cadena hidrocarbonada en zig-zag, coincide con el obtenido por nosotros, lo que confirma la tesis de que la disposición de las moléculas en el comienzo de la fase sólida, que correspondería al gel tridimensional, es la que hemos descrito anteriormente. La pequeña diferencia del área de base molecular del ácido palmítico, puede ser debida a un ángulo menor del enlace C-C, lo que supondría un mayor radio de giro de la molécula. Con esto habíamos confirmado la influencia de la disposición de la cadena carbonada en el área ocupada por la misma, que no depende solamente del radio del grupo polar. El colapso de las monocapas de compuestos saturados, está situado sobre los 18 \AA , con una presión superficial del orden de 30 dinas por centímetro, que corresponde a un empaquetamiento total de las moléculas, sin posibilidad de rotación, que estarán, entonces, dispuestas como en estado cristalino.

Los resultados deducidos de las curvas de compresión para las áreas moleculares del ácido láurico, indican un estado físico diferente según la temperatura a que se opera y distinta de la de los otros compuestos saturados, lo cual confirma que, el punto de transición depende, en gran medida, de la temperatura crítica de cada sustancia. En la zona de elevadas concentraciones superficiales se advierte una meseta de transición -estado mesomorfo- igual a la indicada por otros autores. A partir de nuestras isotermas, hemos determinado el momento dipolar de este ácido — $m = 1,581$ debyes—, así como la ecuación de estado de la monocapa, deducida teniendo en cuenta las acciones eléctricas de las moléculas en la misma, de acuerdo con las hipótesis de Guastallá.

Al operar con el ácido oleico, el área molecular de colapso de la monocapa $-20,5 \text{ \AA}^2$ es mayor que para los ácidos saturados, lo que consideramos es debido al estado líquido de este último en su fase

tridimensional. Si se eleva la temperatura, el área de colapso es mayor, como corresponde a una energía cinética de las moléculas más elevada; en cambio, el área de base molecular extrapolada que corresponde a este ácido es de 48,5 Å² mol⁻¹, lo que es lógico, si suponemos que la cadena carbonada se ensancha, por la correspondiente alternancia de los átomos de carbono situados en zig-zag, debido a la posición que ocupan con respecto al doble enlace. El momento dipolar calculado con los datos de las isothermas correspondientes -2,11- es mayor, en este caso, que el que se obtiene para los compuestos saturados, por lo cual, los componentes con cadena olefínica, tienen en la membrana un mayor poder de expansión.

En una publicación posterior (99), dimos cuenta de las isothermas de compresión de las monocapas de los ácidos esteárico y oleico, obtenidas sobre soporte salino y a diferentes p H. Las películas de ácido esteárico obtenidas en estas condiciones y en la zona de pH 1 a 3, presentan las mismas características. Ello nos induce a pensar que en esta zona de acidez las moléculas que integran la monocapa están en su casi totalidad en forma no ionizada, disminuida aún más por la elevada fuerza iónica del soporte.

La expansión de las monocapas por la presencia de electrolitos en el sustrato, se ha atribuido por algunos autores al aumento que, por ello, experimenta la tensión superficial del mismo. Todos parecen olvidar que la fuerza de interacción entre las cargas de los grupos polares es de tipo eléctrico, y que la magnitud de tal fuerza es inversamente proporcional a la constante dieléctrica del medio. De acuerdo con la ecuación de estado termodinámica, aplicable en estas condiciones, el valor de la presión superficial resulta igual a la diferencia entre la presión térmica y la presión interna. Si la presión interna disminuye como consecuencia de un aumento de la constante dieléctrica del soporte, la presión del film aumenta, para un mismo valor de área, a medida que la constante dieléctrica se hace mayor. Si al aumentar la constante dieléctrica queremos que la presión se mantenga constante, podemos conseguirlo, bien disminuyendo la temperatura y manteniendo la superficie constante, bien aumentando la superficie disponible a temperatura constante.

Puesto que las compresiones se realizan en condiciones isotérmicas, sólo cabe aquella última posibilidad y serán, por tanto, necesas-

rias mayores presiones, para alcanzar un valor determinado del área molecular en las películas extendidas sobre la solución de electrólitos. Este efecto no es directamente observable en la fase sólida superficial, cuando se alcanza el empaquetamiento máximo, que corresponde al área molecular media de su sección transversal.

En la organización de los fosfolípidos en la membrana hay que tener por consiguiente, en cuenta, no sólo las cadenas hidrocarbonadas y los grupos polares, sino también la carga neta que aquéllos pueden presentar: por ejemplo, en las bicapa, de fosfolípidos de cerebro de buey, que tienen valor negativo, los cationes existentes en el medio que les rodea, originan una ordenación inducida por el efecto salino, que depende de la carga y concentración del mismo, formándose una estructura, que puede ser muy significativa en las funciones de este sistema biológico. El poder condensante de los cationes, sigue la relación siguiente: $\text{Na}^+ = \text{K}^+ = \text{L}^+ < \text{Mg}^{2+} = \text{Ca}^{2+} < \text{La}^{3+} < \text{Th}^{4+}$, sin que en ello influya en grado notable su acción osmótica, puesto que, soluciones isotónicas de distintos compuestos, producen efectos muy diferentes. Habría que pensar siempre en la unión de estos cationes con el agua y con las moléculas que forman el grupo polar, en un conjunto coordinado. En general los aniones no tienen acción efectiva.

La composición lipídica de la membrana puede variar según los componentes del medio en que se desarrolle la célula. Experiencias de este tipo han sido muy utilizadas, operando con una colonia de *Mycoplasma laidlawii*. Los estudios realizados por Engelman (100), sobre membranas de este microorganismo, por difracción de rayos X, indican que, a baja temperatura, los fosfolípidos están empaquetados en una fase hexagonal (α gel) y al elevarse la temperatura, se funden las cadenas, aumentando el área por molécula desde 40-45 a 60-70 Å, es decir, se produce una transición típica de fase hexagonal a líquido cristalino, con gran cantidad de agua. Melchior y col. (101), han demostrado que la temperatura a la cual se desarrollan las células del *M. Laidlawii*, influye sobre el valor del punto de transición o de fusión de las cadenas carbonadas y Phillips y col. (102) consideran que entre las bicapas de los lípidos pueden estar sequestradas, incluso moléculas de otro tipo. Asimismo por incorporación de ácidos grasos con spin marcado en la dieta de este microorganismo, se han

podido establecer algunas de las características de este sistema biológico, expuestas anteriormente (103).

Todas las investigaciones a las que nos hemos venido refiriendo hasta ahora, corresponden a membranas que no contienen colesterol. Si éste existe en la misma, se produce una clara condensación del sistema, originándose variaciones en los cambios de fases, evitándose hasta las transiciones de gel a líquido cristalino, con estructuras que, en general, son insensibles a la temperatura.

Los estudios de Smith (101), realizados por medio de espectroscopía de resonancia de spin marcado, sobre la organización y fluidez de multicapas de fosfolípidos hidratados, son muy demostrativos a estos efectos. El citado autor utiliza el colestano (CSL), con un nitróxido paramagnético unido al núcleo del esteroide, el cual, por su carácter hidrofílico, se localiza en los grupos polares, pudiendo, en estas condiciones, explorar la organización de la cadena lipídica hasta 15 Å de profundidad. Del estudio de los espectros correspondientes, se infiere que el colesterol tiene un gran efecto sobre la viscosidad macroscópica de los films de lecitina de huevo, produciendo un empaquetamiento casi rígido de las cadenas hidrocarbonadas, con un elevado grado de ordenación, impidiendo que puedan llegar a rotar a lo largo de su eje vertical. Cuando la lecitina está hidratada pero sin colesterol, se produce también una ordenación apreciable, pero con un espaciado suficiente entre las cadenas carbonadas, como para que éstas puedan girar. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en las medidas de presiones superficiales (105), y espectros de RNA (106). El aumento del grado de orientación de las cadenas carbonadas y el descenso de la velocidad de rotación, va creciendo a medida que es mayor la cantidad de colesterol añadida, siendo máxima cuando éste se encuentra en una proporción de alrededor del 50 por 100.

De todos los resultados obtenidos, se deduce que, a una determinada temperatura, la presencia de colesterol produce en las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de diferentes fosfolípidos, un estado de «fluido intermedio». En aquellos lípidos que se encuentran, normalmente, por encima de su temperatura límite de transición se reduce el movimiento de sus cadenas al añadirles colesterol, mientras

que los lípidos que, en condiciones biológicas, se encuentran al estado de gel, adquieren una mayor fluidez (107).

Utilizando derivados del colesterol con una cadena lipídica lateral, dotada de un nitróxido localizado en distintas posiciones de la misma, se puede estudiar el efecto condensante de aquél a diversas profundidades (104). El análisis de los espectros correspondientes indica que el efecto de ordenación del mismo, llega hasta el carbono-12, mientras que en su ausencia, el grado de movilidad de los grupos metileno va aumentando, gradualmente, desde el grupo polar de cabeza hasta el situado en la parte terminal.

Veamos ahora la influencia de la estructura del esteroide en los efectos que comentamos. El colestano da lugar a un orden comparable al del colesterol, lo cual indica que el doble enlace 5-6 no es esencial para producir un sistema ordenado. Por el contrario, el coprostanol que tiene una configuración opuesta en la posición 5 (cis), es incapaz de actuar como elemento ordenador. Ello nos indica que un núcleo esteroide transplanar es indispensable para una ordenación correcta. Variando los grupos metileno, o los dobles enlaces del núcleo del esteroide, se produce muy poca variación en su capacidad para estructurar ordenadamente la capa lipídica. En cambio, al suprimir la cadena hidrocarbonada en la posición 17, se reduce en forma muy apreciable dicha propiedad. Si se invierte el grupo 3 OH de la forma β a la α , se pierde su poder activo. O sea, que el grupo hidroxilo en posición 3 β es absolutamente necesario para la capacidad de ordenación de estos compuestos. El β -sitosterol, que es el 24-etil derivado del colesterol y que se encuentra, por lo general, en las plantas, tiene tanta efectividad para imponer un cierto orden en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, como el colesterol. Esto hace suponer, que, dicho compuesto, es el principal responsable de la disposición ordenada de los lípidos en las membranas vegetales.

Todo parece indicar que, por lo menos uno de los papeles más importantes y generales de los esteroides, en la membrana, sea regular la ordenación de los componentes lipídicos y su fluidez. El efecto condensante tiende a aumentar la rigidez de la bicapa, regulando, por ello, las interacciones lípido-proteína. El aumento de las dimensiones de la bicapa y la disminución de su fluidez, suponen un descenso de la permeabilidad de la misma. Así las propiedades permeables pasivas

de una membrana particular, pueden estar determinadas por su contenido en lípidos y esteroides, mientras que algunas de las permeabilidades selectivas más delicadas, son, sin ninguna duda, originadas por proteínas específicas o enzimas. No obstante, estos sistemas específicos pueden ser controlados, a su vez, secundariamente, por el efecto de condensación del esteroide, a través de las interacciones lipido-proteína.

Según Caspar y Kirschner (108), la distribución del colesterol en la membrana no es simétrica. En consecuencia, es posible que, dado que este compuesto no se encuentra en cantidades equimoleculares en relación con los lípidos totales de la misma, la asociación que entre ellos se pueda formar esté distribuida sólo en determinadas áreas, como ha sido observado en los eritrocitos humanos. Esto daría lugar a una permeabilidad diferente en determinadas partes de aquélla.

Puesto que todo el colesterol puede ser eliminado de la membrana, es posible que los eritrocitos actúen como un reservorio del mismo en su intercambio con el plasma. Con ello se modificaría la permeabilidad y la fragilidad osmótica de los glóbulos rojos. Por lo tanto, parece importante conocer qué sustancias pueden interaccionar con el colesterol, modificando su contenido plasmático y desequilibrando las proporciones fisiológicas óptimas. Por esto, y dada la circunstancia de la utilización cada vez más generalizada de ciertos tensioactivos en la dieta alimenticia y en diversos productos farmacéuticos, nosotros hemos estudiado la interacción del mismo en capas monomoleculares con detergentes no iónicos (109), llegando a la conclusión de que se producen asociaciones mixtas, con miscibilidad completa de ambos componentes, a bajas presiones, y con la aparición de una fase independiente de colesterol a presiones elevadas. Por otra parte, hemos observado que los ésteres de sorbitano solubles -tween 60 y 80- también presentan fenómenos interactivos con este compuesto, operando en monocapas (110).

En diversos trabajos se pone de manifiesto la solubilidad del colesterol en ciertos tensioactivos, hasta un límite máximo del 5-6 por 100, así como al efecto que los mismos producen en la absorción y movilización de aquél en su metabolismo general. En algunos casos, se indica por el contrario, un fenómeno de inmovilización. Por ello, nos ha parecido importante abordar el estudio de la estructura confor-

macional del complejo de asociación tween 60-colesterol, obtenida en proporciones diferentes y en presencia de agua (111), para intentar explicar con ello los fenómenos contradictorios anteriormente apuntados. A distintas proporciones de tween, colesterol y agua, se presentan estructuras que corresponden a fases laminares, hexagonales o isotropas, con propiedades físico-químicas tan diferentes como para poder suponer comportamientos biológicos totalmente distintos.

La ordenación de las proteínas en la membrana está ligada asimismo, en determinadas condiciones, a la conformación de los fosfolípidos que forman la bicapa de la misma, aunque este hecho no sea general (104). De los estudios realizados con diversas proteínas, se puede concluir que, el efecto ordenador depende del número absoluto y relativo de cargas positivas y negativas de la misma, así como del número de aminoácidos hidrofóbicos, de su movilidad y de la verdadera forma y tamaño de la proteína.

Diversos autores han sugerido que la organización estructural de los fosfolípidos en la membrana, puede ser alterada en grado muy apreciable por la acción de algunos agentes exógenos. Bangham y colaboradores (112), de acuerdo con la hipótesis establecida por Willmer (113), consideran que los esteroides pueden ejercer su acción farmacológica, regulando la permeabilidad de las membranas celulares, ya que se ha demostrado directamente, su interacción con algunos compuestos lipídicos. Por nuestra parte (114), hemos estudiado las propiedades de las capas monomoleculares de los esteroisómeros del pregnanodiol, para conocer sus características en las interacciones con los lípidos. La serie 5 β , correspondiente a una forma cis, origina las monocapas más extendidas, lo que se explica por su estructura más flexible. La posición α o β de los sustituyentes en 3 y 20, da lugar a monocapas con una cierta expansión, cuando éstas se encuentran en el mismo lado del plano formado por los anillos del esteroide y monocapas más condensadas si los dos son α o β . En el caso del 5 α - pregnano : 3 β - 20 β 20 diol, la isoterma de compresión es típicamente condensada, con áreas moleculares mínimas de alrededor de 20 Å² mol, lo que nos hace pensar que el grupo OH situado en la posición 20, es el responsable de esta disposición estructural. Las monocapas mixtas obtenidas con estos compuestos y trioleína y triestearina, po-

nen de manifiesto interacciones importantes en relación con la estructura conformacional adoptada, respecto a su configuración esteroisómera.

Consideremos ahora la acción de los antibióticos poliénicos sobre la membrana. La filipina y la etruscomicina facilitan la liberación de la glucosa de las partículas lipídicas, contengan éstas coloesterol o no, aparentemente, sólo cuando el colesterol existe en la estrucutra de los lípidos (115). Por su parte, Smith y col (116), demuestran que estos antibióticos, así como la anfotericina B y la miprocina, en cantidades similares a las que se usan en la práctica farmacológica, producen un efecto destructivo importante en la organización de multicapas de fosfolípidos perfectamente ordenadas con colesterol. El efecto producido, depende de la naturaleza de los lípidos y de la cantidad de colesterol presente.

Los fenómenos de anestesia han sido relacionados, desde hace tiempo, con las condiciones que se refieren al orden en la membrana. Actualmente, es bien conocido que los anestésicos disminuyen la organización de la lecitina o de capas lipídicas de cerebro a muy baja concentración (117) Bamghman y col (118), que han estudiado la permeabilidad catiónica de las partículas de lecitina-ácido-diacetilfosfórico frente a la acción de determinados alcoholes, cloroformo, éter, etcétera, consideran que la acción narcótica, originada por estos compuestos, se produce por un aumento de permeabilidad catiónica de los lípidos, dicha variación es en dirección opuesta y, aparentemente, parece debían producir un efecto físico-químico distinto. Sin embargo, su efecto es paralelo al que producen la tetrodotoxina, la xilocaína y el disulfonato-etano-proclorperacina sobre el nervio ciático de la Rana pipiens sobre el cual ejercen una acción a anestésica local. Hille (119), ha observado, al estudiar el potencial de membrana, que estos agentes actúan primero reduciendo al máximo la conducción del sodio a su través, sugiriendo que los canales o por los que éste atra-

viesa el nervio, se cierran y obstruyen individualmente, por la unión de la molécula del anestésico en forma catiónica, formando en su interior estructuras complementarias.

Las investigaciones realizadas por Smith (120), en multibicapas de fosfolípidos organizados estructuralmente, indican que los anestésicos locales, tales como la procaína y la tetracína, aumentan la ordenación de los lípidos a bajas concentraciones, pero destruyen dicho orden a partir de cierto valor. El mismo autor, ha estudiado la acción de los alcoholes como anestésicos, en diversos modelos de membrana, poniendo en evidencia que el receptor de los mismos es la bicapa lipídica de la misma, apuntando que la anestesia puede ser el resultado de pequeños cambios en su organización. Cuando se alcanza una concentración bastante elevada, se produce un cambio de fase o la formación de liposomas. Sin embargo, con el complejo lecitina-colesterol, aunque los films aparecen que se erosionan con más facilidad, el cambio estructural no se produce hasta llegar a las mismas concentraciones que en los otros sistemas estudiados. Esto parece indicar que los residuos hidrocarbonados de los lípidos, son los responsables de los cambios de orientación en la bicapa, en mucha mayor proporción que los residuos polares. Este desorden produce una inhibición de la hemólisis de los eritrocitos, y un descenso de la resistencia de las membranas lipídicas utilizadas como modelos de estudio.

En un trabajo recientemente publicado (121), al estudiar los espectros del RMN en diferentes anestésicos locales, se pone de manifiesto la interacción hidrofóbica de estos compuestos con la lecitina y diversas mezclas de fosfolípidos. De los resultados obtenidos, se pueden deducir las siguientes observaciones: a) la zona correspondiente a la estructuración de los grupos glicerol, así como, los 3-4 primeros átomos de carbono de las cadenas de los ácidos grasos de la bicapa fosfolipídica, presentan un fuerte empaquetamiento molecular; b) la existencia de una cadena hidrofóbica de 4 átomos de carbono, en el extremo no polar, permite a la tetracína interactuar con el film lipídico aún en ausencia de una carga neta negativa; c) las moléculas de anestésicos locales que no poseen una cadena de elevado carácter hidrofóbico, interactúan primero electrostáticamente con las bicapas cargadas, y posteriormente penetran en su interior; no existe interacción cuando aquéllas no presentan alguna carga; 4)

el ensanchamiento diferencial de las cadenas hidrofóbicas del anestésico en la parte polar de las moléculas, indica la existencia de agua estructurada en la superficie de la bicapa y permite estimar su magnitud y c) el orden relativo de la energía de las interacciones hidrofóbicas de las sustancias estudiadas, está en relación aparente con la potencia y duración del efecto anestésico y su capacidad para desplazar los iones Ca^{2+} de la superficie de la membrana. Estos resultados concuerdan con las investigaciones de Hardy y col. (122), que se refieren a la acción de ciertos anestésicos locales sobre microemulsiones, líquidos cristalinos y membranas de eritrocitos, alterando las fuerzas interfaciales y el estado orientado de los lípidos, hasta llegar a producir la destrucción de la estructura de líquido cristalino.

Teniendo en cuenta que los anestésicos locales no siguen la regla. de Meyer Overton, y que, en todo caso, el coeficiente de reparto sólo ejerce una parcial influencia en su acción de bloqueo, Skou y colaboradores (123), han estudiado la relación que existe entre la potencialidad de la droga y su capacidad de penetración en capas monomoleculares de ácido esteárico y lípidos de membrana de fibra nerviosa; aumentando la presión superficial. Según el propio Skou, la penetración del anestésico en la membrana, puede originar probablemente; un cambio en la permeabilidad de la misma, al ion sodio, por variación del tamaño efectivo de su porosidad.

Nosotros hemos pensado que la acción anestésica local, pudiera: ser debida a las variaciones que los compuestos con esta acción farmacológica, originan en la conformación estructural de las lipoproteínas existentes en las membranas celulares de las fibras nerviosas; debido al gran polimorfismo de los lípidos y a su posible alteración por el tratamiento con estas drogas. Con objeto de llegar a establecer una teoría coherente con suficiente base experimental, se ha establecido un diagrama de fases, perfectamente delimitado, con un modelo lipídico simple, clorhidrato de lidocaína y agua (124), observando un cambio estructural notorio en la conformación del sistema lípido-agua, por la adición del mencionado anestésico. Las cantidades adecuadas para producir una estructura laminar en el sistema lipídico estudiado, deben de estar relacionadas con su actividad farmacológica más intensa. En apoyo de estas consideraciones, podemos mencionar los siguientes resultados: a) en la proporción del 50 por 100 del sis-

tema lípido-agua, el paso de la fase hexagonal a la laminar no se produce hasta que se añade un 10 por 100 de anestésico. Si el lípido se encuentra en mayor cantidad -60 por 100-, el cambio a la estructura laminar sólo ocurre con el 20 por 100; b) para proporciones de lípido más elevadas, es difícil que aparezca dicha estructura, y cuando son inferiores al 50 por 100, pueden coexistir las dos fases y c) por encima y por debajo de los valores en que se presentan mezclas: con fase hexagonal y laminar, y cuando se está ya a una cierta distancia de la línea de separación, que en el diagrama delimita estas regiones, sólo se encuentra una fase hexagonal e incluso, la formación de un líquido isótropo en el que está embebida esta última estructura, originándose finalmente la separación de dos fases líquidas. Esto hace pensar en la posible acción perjudicial que pueden presentar cantidades excesivas de anestésico, al producirse una alteración irreversible en la estructura conformacional de la membrana.

Continuando con estos estudios, Otero Pastor ha presentado en el último Congreso de Biofísica de Moscú (125), un trabajo que se refiere al sistema lidocaína-lecitina-colesterol-agua, estableciendo los diagramas ternarios y cuaternarios correspondientes, para definir las diferentes fases que en este caso se pueden presentar.

La adición del anestésico a la lecitina, en presencia de agua, origina un acusado polimorfismo, aunque esté atenuado por existir colesterol, lo cual indica una vez más, que este lípido neutro ejerce una acción ordenadora y protege, en cierta medida, de los cambios estructurales que pueden producirse, en un sistema lipídico, por la acción de cualquier agente externo.

Los estudios que se están realizando en la actualidad por Otero Pastor, operando con difracción de rayos X a bajo ángulo de incidencia, han puesto de manifiesto que la adición de clorhidrato de lidocaína, a diferentes mezclas del sistema agua-lecitina, no sólo no produce un aumento de los espaciados interlaminares, como parece que debía ocurrir, según los trabajos de Skou ya citados, sino todo lo contrario. Se trata entonces de conciliar estos datos con los resultados de otras investigaciones, sustituyendo el citado anestésico,

para llegar a fijar el «sitio» y la acción primaria que pueda condicionar la subsiguiente actuación de aquél.

Citemos, por último, cómo desde hace mucho tiempo, se ha sugerido que la acción bactericida de ciertos fenoles, se debe a la destrucción de la membrana citoplasmática. Este fenómeno ha sido revisado recientemente por Proudfoot (126), quien plantea la cuestión de si dicha membrana, es afectada directa o indirectamente por los compuestos fenólicos, observando una notable reducción en la cohesión lateral total de las moléculas de monocapas de trietanolamina, situadas en forma empaquetada.

Los experimentos realizados por Kaye y Proudfoot (127), sobre la capacidad relativa de varios fenoles para colapsar estas monocapas, tienen el mismo orden y magnitud relativa de sus coeficientes bactericidas.

EL ORDEN EN LOS PROCESOS DE DIGESTIÓN DE LAS GRASAS

Estudiemos ahora finalmente, un proceso biológico, como el de la absorción y digestión de las grasas, en el que, las asociaciones moleculares orientadas en una adecuada ordenación, juegan un papel primordial para el desarrollo del mismo.

Las grasas ingeridas en la alimentación y que están formadas en su mayor parte por triglicéridos, son emulsificadas por la bilis y posteriormente escindidas por la lipasa pancreática para dar ácidos grasos y 2-monoglicéridos como productos finales (128). Aunque los mismos son insolubles, en medio acuoso, se dispersan fácilmente en soluciones de sales biliares, formando asociaciones de tipo micelar, como se demuestra por la composición de la fase que se aísla al centrifugar el contenido intestinal, extraído durante el citado proceso. Esta dispersión micelar atraviesa las paredes del intestino delgado, o sea, que las sales biliares transportan los lípidos insolubles hacia el torrente circulatorio y los disponen en condiciones adecuadas para su ulterior metabolismo.

Los experimentos realizados por Hofman (129), indican, con claridad, el poder de las sales biliares para dispersar los lípidos polares, en una forma diferente de interacción que la que correspon-

de a los compuestos con cadenas parafínicas, debido a la presencia del núcleo hidroxilado del ciclopentanofenantreno. En general, se puede decir que, para que un lípido con una cadena hidrocarbonada, se disperse por las sales biliares, es esencial la formación de un agregado de tipo líquido cristalino, sea éste laminar, cilíndrico o isotrópico. La fase mesomórfica se forma con monoglicéridos no saturados o con compuestos saturados de larga cadena, como la monomiristina o la monopalmitina.

La temperatura de transición para los 1-monoglicéridos, es de 15 a 300 inferior al punto de fusión de la forma cristalina en estado anhidro. Si los cristales se dispersan en una solución de sales biliares mejor que en el agua, la temperatura de transición es aún unos grados más baja. A 370 la monolaurina forma una fase líquido cristalina en soluciones de sales biliares, lo que no ocurre con la monomiristina y la monopalmitina. Según esto, a la temperatura del cuerpo humano, solamente los lípidos no saturados o la mezcla de lípidos saturados, que tienen una temperatura de transición muy próxima a la del cuerpo humano, pueden ser dispersadas por las sales biliares.

No habiendo encontrado en la bibliografía consultada por nosotros en 1953, ningún trabajo acerca de las propiedades de las monocapas de ácidos biliares, excepto los estudios que Adam y col. (130) habían realizado sobre las de los ácidos apocólico y β -apocólico, obtuvimos en nuestros laboratorios, por vez primera, las isotermas de compresión de monocapas de los ácidos cólico, glicocólico, taurocólico y desoxicólico (131). Posteriormente, y en colaboración con el profesor Cadórniga se han revisado estos trabajos empleando sustancias más puras y métodos más precisos (132). En todos los casos, se advierte que al comprimir la monocapa, se presenta el paso de una fase de líquido expandido a un estado de líquido condensado, observándose también, en algunas circunstancias, un estado mesomorfo intermedio. Las magnitudes moleculares que definen cada uno de los puntos de transición varían para cada ácido biliar, pero siempre entre unos límites determinados.

Suponemos que la unión de la molécula del ácido biliar al enderezarse por compresión sobre el soporte, se realiza por el hidróxilo situado en posición 3, debilitándose o rompiéndose la unión del agua

con el carboxilo de la cadena lateral. Intentamos así explicar las distintas magnitudes moleculares halladas para los cambios superficiales de estado o de fase de los ácidos biliares, por el número y disposición de los OH que cada compuesto posee en su estructura, de acuerdo también con los valores ya conocidos de los esteroides y otras sustancias de análoga constitución.

El estudio de las isothermas de compresión en la zona de elevadas concentraciones, nos ha permitido determinar las áreas moleculares que corresponden al estado sólido y al estado sólido empaquetado. El área de base molecular, que oscila entre 50 \AA^2 mol para el ácido desoxicólico y 60 \AA^2 mol para el ácido cólico, se justifica suponiendo una rotación de la molécula alrededor de la línea eje que pasa por el OH situado en posición 3. El área de colapso, $40,45 \text{ \AA}^2$ mol, es siempre mayor que la sección horizontal máxima de la molécula del ciclo, pentanofenantreno, lo cual parece indicar la inclinación del ácido biliar, aun en estado sólido empaquetado, como consecuencia lógica de la atracción polar de los grupos que pueden quedar situados fuera del agua. Asimismo, las investigaciones realizadas sobre las monocapas de los ácidos biliares a distintas temperaturas, demuestran la flexibilidad de su estructura molecular, y la poca influencia que en las magnitudes que caracterizan un cambio de estado o de fase superficial, produce la modificación de la cadena lateral de estos ácidos; tan sólo un pequeño aumento del área de colapso -48 \AA^2 mol- parece indicar una mayor inclinación de la molécula, por atracción hacia el agua de los grupos polares que en dicha cadena se pueden presentar.

Los primeros trabajos sobre las monocapas de ácido colánico, se deben a Ekwall (133), quien estudia la influencia que sobre la isoterma de compresión de este compuesto ejercen la temperatura y la concentración de cloruro sódico en la subfase. Más tarde, confirma los resultados obtenidos en el primer trabajo y extiende sus investigaciones a los ácidos desoxicólico, cheno-desoxicólico, cólico y litocólico (134).

Por nuestra parte, hemos estudiado más recientemente las isothermas de compresión de los ácidos colánico, cólico y desoxicólico, sobre soluciones 3M de cloruro sódico a pH 1-3 (135). Los resultados correspondientes al ácido cólico, están más de acuerdo con los señalados anteriormente, que con los de Ekwall. En nuestras isothermas de

compresión no aparece fase sólida monodimensional, ni el estado tridimensional de la película colapsada. La presencia de una fase sólida monomolecular, con un área de base de $60 \text{ \AA}^2 \text{ mol}$, obtenida sobre agua, coincide con la encontrada por nosotros en el límite de la «fase líquido condensado» cuando el sustrato contiene ClNa3M . En el ácido desoxicólico, el área correspondiente a la fase líquida condensada $-148 \text{ \AA}^2 \text{ mol}$ -, es muy parecida a la que se determina para la fase líquida expandida, en la isoterma obtenida por Cadórniga y Otero trabajando sobre agua, y que es de $110 \text{ \AA}^2 \text{ mol}$, muy próxima a la obtenida por Ekwall. Al alcanzar una presión de 16 dinas/cm , la compresibilidad de la monocapa aumenta hasta un área molecular de 65 \AA^2 y $2,5 \text{ dina por cm}$., punto que consideramos como el comienzo del estado de equilibrio con la fase tridimensional.

Los resultados obtenidos para las isotermas de compresión del ácido colánico sobre soporte salino y sobre agua y en las mismas condiciones de pH 3, demuestran que las conclusiones a las que hemos llegado, al estudiar la influencia de la elevada concentración salina del soporte, en las propiedades de las películas superficiales de los ácidos grasos (99), pueden ser generalizadas a moléculas de diferente estructura. Análoga influencia del soporte salino, se deduce del examen de la isoterma del colesterol, obtenida por Ekwall.

Ello explica que en nuestras curvas presión-área sobre ClNa3M , aparezcan para las mismas fases, áreas moleculares mayores que las determinadas sobre solución clorhídrica 10^{-3} .

Las discrepancias con algunos de los valores dados por Ekwall sobre soportes de la misma naturaleza, son debidas, a nuestro juicio, al hecho de que la compresión automática, a velocidad uniforme, realizada por este autor, no permite a la monocapa, integrada por moléculas voluminosas y por tanto, de difusión lenta, alcanzar el estado de equilibrio.

En la isoterma del ácido desoxicólico, aparece una fase tridimensional, que se produce como consecuencia del colapso de la película en estado líquido condensado. La del ácido cólico, no presenta fase sólida de ningún tipo, propiedad que ya hemos señalado para las películas de este compuesto extendidas sobre agua.

Las consideraciones anteriores, nos permiten interpretar estos resultados relacionándolos con las ideas de Ekwall, considerando que,

cuando se trata de moléculas polifuncionales se forman multicapas con gran facilidad. Así observamos directamente, la tendencia a la formación de agregados, que será mayor en el ácido cólico, que en el desoxicólico, como consecuencia de incluir en su molécula un grupo polar más. Por este motivo, las capas multimoleculares, aparecen en aquél a presión más baja y a un área molecular mayor que en el desoxicólico, conservando no obstante, la libertad característica del estado líquido.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce, que las sales biliares pueden formar agregados unidos a través de sus regiones hidrofóbicas, a baja concentración y que, a concentraciones más elevadas, estos agregados se unen, a su vez, por sus zonas hidrofílicas por medio de enlaces de hidrógeno. Es decir, que primero se forman unos dímeros y al aumentar la concentración se producen micelas mayores, las cuales son muy diferentes según existan dos o tres hidroxilos en el anillo del ciclopentanofenantreno (136). Si se trata de compuestos con tres hidroxilos, se originan en soluciones de CINa 1N, agregados que contienen de siete a nueve monómeros; en cambio, los compuestos con dos hidroxilos, como el glicodesoxicolato o el chenodesoxicolato, llegan a agrupar 63 moléculas en soluciones 0,5 N de Cl Na . Esto indica que la formación de grandes micelas no es específica del grupo OH, situado en posición 7 ó 12, sino del número de O H de la molécula. Los compuestos dihidroxilados, precipitan a muy baja concentración salina -0,08 N-, mientras que los trihidroxilados no se separan de la solución hasta que ésta tiene un contenido, en sales 3N. Como el aumento del número de agregación en detergentes no iónicos, se sabe que depende de la capacidad de deshidratación de sus grupos polares, hay que suponer que en las sales biliares con dos hidroxilos, esto se realiza con más facilidad.

La elevación de temperatura favorece la unión por enlaces hidrofóbicos, lo que origina una mayor estabilidad. En cambio, este factor aumenta la repulsión entre los grupos polares, lo que hace descender la estabilidad del complejo formado. En los compuestos trihidroxilados, la temperatura ejerce muy poca influencia en su estabilidad, lo cual parece indicar que existe un equilibrio, contrabalanceado, entre las fuerzas de los enlaces hidrofóbicos y la que corresponde a la de los grupos polares. Por el contrario, en los agregados que se forman a

partir de los compuestos dihidroxi, al aumentar la temperatura disminuyen en su tamaño, lo que indica que en los mismos predomina la interacción iónica. En todos los casos, si se produce una fuerte deshidratación de los OH, como por ejemplo por la acción de la urea, el número de moléculas asociadas decrece.

Teniendo en cuenta que las moléculas de los lípidos, el colesterol y sus derivados, extendidos sobre la superficie del agua, adoptan una disposición similar a la que presentan en las micelas y dada la posibilidad de obtener capas monomoleculares de ácidos biliares, tal como indicamos anteriormente, hemos realizado una serie de trabajos en colaboración con el profesor García Fernández, encaminados a estudiar las asociaciones de ácidos biliares y ácidos grasos en capas monomoleculares mixtas, teniendo en cuenta que como observaron Desnuelle, Molines y Dervichian (137), estudiando las mezclas de fosfátidos y triglicéridos naturales, las películas más estables eran obtenidas con las mismas proporciones moleculares, que, analíticamente, se determinaban en las fases acuosas más hidratadas. Los primeros resultados de nuestras investigaciones, fueron expuestos en el III Congreso Internacional de la Detergencia (138), celebrado en Colonia, y posteriormente, en el 1 Congreso Internacional de Biofísica de Estocolmo (139).

En un trabajo publicado en 1964 (140), dimos cuenta detallada de las isotermas de compresión de las monocapas mixtas del ácido cólico, con los ácidos esteárico y oleico. Considerando una película mixta como la proyección en dos dimensiones de una solución tridimensional, el estudiar la variación del área molecular media en relación con la fracción molar, es equivalente a estudiar el cambio del volumen molecular en función de la concentración. Con este objeto se han trazado algunos diagramas, en los que se representan las áreas moleculares deducidas de las redes de isotermas correspondientes, en las mismas condiciones de presión superficial y en función de la fracción molar de los compuestos.

Del estudio de los diagramas de las mezclas de ácido esteárico y cólico, se deduce la formación de dos estructuras superficiales diferentes, con unas asociaciones moleculares bien definidas. Una impuesta por el ácido esteárico y que parece estar constituida por una mo-

lícula de ácido cólico y tres de esteárico. Cuando en una monocapa de este ácido se reemplazan cierto número de sus moléculas por otras de ácido cólico, se produce una variación en la estructura del conjunto, originándose una condensación progresiva de las moléculas de ácido esteárico, hasta que éstas adoptan una posición de sólido empaquetado. El área de las moléculas de ácido cólico dispuestas en esta estructura, también se reduce en una proporción importante.

Cuando en la monocapa, las moléculas se disponen en una relación que contiene menos de una molécula de ácido esteárico por cuatro de cólico, se produce un fenómeno análogo al anterior, pero es entonces el ácido cólico el que impone su estructura, de tipo líquido, con una fuerte condensación, a su vez, del ácido esteárico. Para las composiciones intermedias, el conjunto se comporta como una yuxtaposición, en distintas proporciones, de los dos tipos de estructuras: 3-1 y 1-4.

Siendo las monocapas de estas mezclas de tipo condensado, se puede pensar que las condiciones de simetría, agrupamiento y forma, intervienen en la disposición de las moléculas de una especie con respecto a la del otro, originándose verdaderas redes superficiales, cuadradas, triangulares, hexagonales, etc., en las que se pueden realizar sustituciones, que mantienen la estructura hasta un cierto límite, que corresponde a lo que pudiéramos llamar concentración de saturación de dicha red, índice de coordinación o proporción estequiométrica de la asociación molecular formada. En cada caso, se impone la estructura correspondiente, que es base de la retícula molecular, variando las áreas parciales de cada componente, debido a las interacciones y efectos condensantes o de expansión que pueden presentarse.

Una situación análoga a la descrita, se deduce de las isothermas obtenidas de las mezclas de ácido oleico y cólico; en este caso, las dos estructuras aparecen en las proporciones 4-1 y 1-4. La primera está impuesta por el ácido oleico, y la segunda corresponde a la red molecular del ácido cólico, siendo el estado físico de las dos, de tipo líquido condensado.

Si se atribuyen las diferentes estructuras a un ensamblaje directo de las moléculas en la monocapa, como una consecuencia, tan sólo, de factores de simetría molecular, nos encontraríamos con el hecho paradójico de que, para bloquear una molécula de ácido cólico, se

necesitaría un número de moléculas de ácido oleico mayor que de ácido esteárico, cuando el área molecular base del primero, con un doble enlace en posición *cis*, es mayor que la del segundo. Por eso, es preciso considerar cierto tipo especial de unión entre las moléculas del ácido cólico y el doble enlace del ácido oleico, con la creación de algún puente de hidrógeno. Las estructuras en que cuatro moléculas -de ácido cólico rodean a una de ácido graso, se pueden suponer formadas gracias a la capacidad que presentan las moléculas del primero, como polifuncionales que son, de asociarse -entre sí, de tal forma, que el agregado final estaría constituido por una molécula de ácido graso y otra de cólico y uniéndose a este conjunto, otras tres moléculas de ácido cólico, resultando así la proporción 4-1.

En un trabajo posterior (141), hemos realizado un estudio de las asociaciones moleculares en monocapas superficiales de los ácidos, cólico, desoxicólico y colánico, con los ácidos oleico y esteárico sobre soluciones 3M de cloruro sódico a pH 3-1. En estas condiciones, las moléculas que constituyen la monocapa están todas en forma no ionizada. Asimismo, se puede observar claramente, cómo la presencia de una sal en el soporte, produce una expansión de la monocapa, que nosotros atribuimos a la disminución que se produce en la presión interna, como consecuencia del aumento de la constante dieléctrica del agua, debido a la presencia de la sal. La acción de los electrolitos y el p H, en estos casos, son análogas a las ya indicadas para las monocapas simples de ácidos grasos (99).

Del conjunto de resultados obtenidos, se puede afirmar, de manera general, que existe una disolución mutua de los componentes en las monocapas mixtas, y que a determinadas proporciones, se producen cierto tipo de interacciones específicas. Cuando se representan los valores de la superficie molecular media, en función de la fracción molar, se observan cambios acusados en la superficie molecular parcial de cada uno de los componentes, para determinadas proporciones, que se atribuyen a variaciones que se producen como consecuencia de factores de simetría, en el sentido cristalográfico del término. Como hemos podido observar, las proporciones en las cuales se originan estos cambios, dependen en su mayoría de la presión superficial, y en consecuencia, de la orientación de las moléculas respecto al soporte. Asimismo, para una explicación más

racional de todos los resultados, es preciso considerar .que la transición de un estado superficial a otro, se origina, sobre todo, como consecuencia de una modificación de las distancias intermoleculares, en cuyo caso, las fuerzas .de van der Waals-London, sufren variaciones muy intensas dada su gran sensibilidad a estas pequeñas diferencias en el rango de cortas distancias (142).

De acuerdo con los resultados de las interacciones entre ácidos grasos y ácidos biliares, se han propuesto los modelos de asociación para explicar los agregados de sales biliares y lípidos polares, teniendo en cuenta que dichas sales pueden formar con ellos fases dispersas esmécticas. El primer modelo, es el indicado por Small (143), para las asociaciones de lecitina y sales biliares. Aunque las sales biliares han sido consideradas en cierto modo, como detergentes aniónicos, existen sin embargo, como ya hemos visto, marcadas diferencias con los mismos, tanto en su estructura como en la formación de agregados micelares, ya que, a pesar de su polaridad, dichos componentes poseen una estructura cíclica, con grupos hidroxilos, unida a una cadena hidrocarbonada, que termina en un grupo carboxilo, conjugado normalmente con la glicina o la taurina. Tendremos así una conformación en anillo rígido, con caras hidrofóbicas e hidrofílicas, la cual está unida a una cadena, también hidrofílica, que presenta una gran movilidad.

En el modelo de Small, que coincide con las consideraciones del balance lipohidrofílico establecidas por Dervichian (144), para alcanzar una energía libre mínima, los agregados micelares están constituidos por una especie de discos o lamelas de lecitina estabilizadas por las sales biliares adsorbidas, que son empaquetadas en dímeros a lo largo del eje de los mismos. La parte no polar del núcleo del ciclopentanofenantreno se sitúa paralelamente a la cadena hidrocarbonada del lípido. Los grupos hidroxilados de las sales biliares se disponen hacia el agua, y a su vez, en las moléculas de estos compuestos, los hidroxilos 3 α se sitúan lo más próximos posibles, mientras que los grupos sulfonados se colocan lo más lejos unos de otros. Este modelo, es compatible con los estudios de rayos X y RMN, poniéndose de manifiesto, además, por esta última técnica, que los grupos metileno angulares de las moléculas de las sales biliares, pueden

estar presentes en el entorno hidrocarbonado líquido, que corresponde a la micela formada.

El modelo de tipo esférico propuesto por Dreher y col. (145), para los ácidos grasos y la monooleína, en el cual las moléculas de sales biliares están adsorbidas por sus grupos hidroxilos y los grupos sulfonados se proyectan hacia el agua, no parece compatible con los datos de RMN y es bastante improbable.

Como ya hemos indicado en los estudios realizados sobre agregados de sales biliares, también en la formación de complejos mixtos con lípidos, se originan unas micelas primarias, que, por adición de sales, pueden dar lugar a formaciones complejas más grandes (hasta 6-9 moléculas), porque decrece la repulsión entre los grupos polares, se produce una deshidratación de los grupos OH no iónicos y se presenta un efecto salino acusado. El que se dispongan las moléculas ordenadamente en un número que es siempre inferior a 9, se demuestra con los modelos geométricos Stuart-Breigleb, ya que sólo 9 ó 10 moléculas, del tipo considerado en las asociaciones estudiadas, se pueden disponer espacialmente para que tengan todas sus partes hidrofóbicas en contacto. Si se agrupan más de 10 moléculas, aparece un espacio en el centro que expone una porción hidrofóbica al medio acuoso. Como puede comprenderse, dicha estructura es muy poco probable. Estas micelas, son por lo general, asimétricas topológicamente, ya que la parte lipofílica de la sal biliar está confinada en una parte interna del espacio ocupado por las mismas, mientras que los grupos hidrofílicos se encuentran hacia el exterior.

En los compuestos en los que existan 3 hidroxilos en el núcleo se pueden formar micelas con un número mayor de moléculas que 10, ya que en este caso, se producen uniones por puente de hidrógeno entre los hidroxilos libres; entonces el aumento de sales produce una deshidratación de los grupos OH no iónicos, pudiendo formarse a su vez, entre los mismos, enlaces de hidrógeno.

Los estudios cinéticos realizados por Hoffman, indican que la variación del equilibrio entre grandes y pequeños agregados, en el sistema monooleína-ácidos grasos, es muy lenta, debido al cambio que tiene que producirse en la propia estructura micelar.

Las micelas de las sales biliares deben de tener una baja densidad

de carga, y por consiguiente, una pequeña concentración de protones en su superficie. Por métodos de titulación directa o indirecta, se observa que las sales biliares rebajan el pH de los ácidos grasos contenidos en el complejo micelar, aumentando por tanto, su ionización. El pK de los ácidos grasos presentes en las micelas de las sales biliares, es similar al que corresponde al pH del contenido del intestino delgado, en los procesos de la digestión y absorción de las grasas, que se debe de producir por tanto, con una considerable ionización entre los mismos. El efecto de compensación se produce con el tampón pancreático, que debe de servir como aceptar de los protones cedidos por el ácido graso. Por tanto, las sales biliares al rebajar el pK de los ácidos grasos, aparecen como mediadores en dicha transferencia protónica.

Los monoglicéridos son mejor dispersados que los ácidos grasos por las sales biliares. Así la especificidad posicional de la lipasa pancreática que da lugar a 2-monoglicéridos, como producto final, es responsable de una elevada solubilidad micelar, aparte de su pH interno. Si la lipasa pancreática no tiene especificidad posicional y origina genéricamente ácidos grasos, la solubilización de los mismos, por las sales biliares, debe estar influenciada fuertemente por el pH intralamelar. Estos factores regulan la evolución bioquímica de la lipasa pancreática.

En el caso de que las sales biliares tengan dos o tres hidroxilos en el anillo, la acción del pH ejerce un efecto muy grande en la formación de micelas secundarias, como ocurre con el litocolato sódica. Aunque exista poco ácido libre, se pueden formar, en estas condiciones, estructuras de tipo gel, por enlace del 3 α hidroxilo de la sal y el grupo carboxilo del ácido. Estas estructuras, tienen seguramente una conformación helicoidal. Los grupos OH en exceso de las sales trihidroxiladas, protegen a éstas de la formación de geles, situando, siempre al sistema en una fase de líquido cristalino, que es la más apropiada, como sistema biológico, para realizar adecuadamente el proceso de la absorción y digestión de las grasas.

Teniendo en cuenta que en la bilis humana se encuentra siempre una determinada cantidad de colesterol, Isakssoon (146), usando diferentes sistemas conjugados de sales biliares, estudió su poder disolvente en relación con el colesterol, y sobre todo, cuando éste

se encuentra asociado con lecitina, observando que en estas condiciones la máxima solubilidad de aquél era del 0,5 al 0,6 por 100. Por su parte, Dervichian (147), ha establecido con todo detalle el diagrama de fases cuaternario lecitina-sales biliares-colesterol-agua, estableciendo las diferentes regiones que corresponden a zonas simples, tales como, solución isotrópica micelar, fase paracristalina lamelar, hexagonal o cúbica, así como, a situaciones de equilibrio. De estas investigaciones se deduce, que el colesterol puede ser incorporado al sistema ternario lecitina-sales biliares-agua, sin importantes modificaciones en su estructura y sin que por. ello aparezcan nuevas fases. Esto parece indicar, que las moléculas del colesterol tienen su parte hidrocarbonada situada paralelamente a las moléculas de lecitina. El problema que se presenta ahora, es explicar cómo se disponen en este conjunto ternario las sales biliares, debido a la existencia en las mismas de grupos hidroxilos y considerando que el espesor de la capa lipídica, que, en un principio, solo contiene lecitina y sales biliares, casi no se modifica por la presencia del colesterol. Una solución razonable de este problema, consiste en suponer que, como los grupos hidrofílicos del núcleo esteroide de los ácidos biliares están en una misma cara, es posible que dos moléculas de estos compuestos se dispongan apareados con los mismos frente a frente, constituyendo. así un dímero, el cual es, en su exterior, totalmente hidrofóbico. Entonces se puede concebir el que agrupamientos de este tipo se distribuyan en la capa lipídica, alternando con las cadenas de lecitina y a su lado, las moléculas de colesterol paralelas a ellas, estando todos los grupos hidrofílicos orientados hacia el agua.

El diagrama de fases completo establecido por Dervichian para las mezclas de los tres componentes de la bilis, en presencia de todas las proporciones de agua, permite considerar no sólo el problema de la estructura y composición de los agregados micelares de aquélla en estado normal, sino también la génesis de la producción de los cálculos biliares. Despreciando los componentes de la misma que se encuentran en pequeñas cantidades y que son solubles en agua, la bilis normal puede ser comparada a un sistema cuaternario, que contenga 0,5 por 100 de colesterol, 85 por 100 de agua, 11,5 por 100 de sales biliares y 3 por 100 de lecitina. Esta composición representa un punto, en el diagrama cuaternario de este sistema, que corresponde a

una zona isotrópica micelar. Si por un proceso patológico varían las proporciones del sistema lectina-colesterol-sales biliares-agua, y se sitúa su punto representativo, en el diagrama cuaternario indicado, fuera de la zona isotrópica y coincide a su vez, en la región donde se presentan dos fases, éstas están compuestas por una dispersión micelar y cristales de colesterol. Entonces, parece razonable suponer que la aparición de estos cristales, sea un requisito previo para la formación de los cálculos biliares. Es decir, que metabólicamente se origine una bilis sobresaturada con colesterol.

En un trabajo reciente (149) se pone de manifiesto, que la bilis humana puede formar, en algunos casos, un sistema trifásico estable, constituido por pequeños cristales, líquido cristalino y solución micelar, cuando existe una elevada concentración de lecitina. Si la máxima solubilidad de colesterol se produjera en la fase de líquido cristalino, en relación con la solución isotrópica que le rodea, esta condición impide que el colesterol se precipite en forma sólida. Este proceso de estabilización puede desequilibrarse rápidamente. Parece por tanto, que la existencia de una mesofase de líquido cristalino, tiene una gran importancia en la transición de los estados litogénicos correspondientes.

Las ideas contenidas en esta disertación nos obliga a considerar cómo los conocimientos físico-químicos de los procesos de transformación que pueden verificarse en nuestro mundo natural, enfocados con una mentalidad de unificación con las leyes físicas de la Naturaleza, son de especial importancia para el conocimiento de los sistemas vivos, y en consecuencia, fundamentales para el desarrollo de las ciencias biológicas, médicas, farmacéuticas, etc., «esta información debe de ser accesible al biólogo, no tanto porque estas leyes y conceptos físico-químicos sean válidos en el conjunto de los organismos vivos, sino porque en la actualidad es ya imposible analizar los fenómenos biológicos, lógicamente, sin tener en cuenta las leyes físicas que rigen la Naturaleza» (149).

Sin embargo nos preguntaríamos con Bernard Lafay: «¿Qué pasará, qué será del hombre cuando los fenómenos vitales y hasta el domi-

nio síquico puedan ser explicados por un desplazamiento electrones ? Al final del camino secular del espíritu, después de franquear las barreras hostiles del Universo opuestas a su conocimiento, afirmando su imperio sobre la materia inanimada y sobre el reino viviente, el hombre se vuelve a encontrar a sí mismo, a confrontar su propia naturaleza. Por haber robado la luz del cielo, Prometeo fue condenado a un sufrimiento eterno y a su propia destrucción. Este mito premonitorio nos obliga a pensar en las responsabilidades de los científicos actuales al estudiar los problemas de los seres vivos».

A esta angustiosa interrogante creo que ha contestado con toda lucidez y humildad, nuestro compañero el profesor Santos Ruiz, en su obra sobre «La Vida y el Espíritu ante la Ciencia» (150). «Sin pretender negar cuanto pueda explicarse por la acción de causas naturales, hay que admitir, filosóficamente, una intervención especial en el origen de la vida. Lo exige por lo menos la realidad trascendente de la aparición del hombre en particular y de la vida en general. Todos los avances del conocimiento actual y futuro, deben de servir para purificar tanto lo científico como lo filosófico de concepciones artificiosas y superfluas. Y puesto que, con toda evidencia, existe una finalidad de progreso inscrita en los poderes de la materia, ello nos debe llevar lógicamente a reflexionar sobre la significación de esta finalidad». Sólo los secuaces del materialismo, epígonos intelectuales del positivismo del siglo XIX, no quieren franquear el umbral de la explicación científica que consideran más que suficiente. En un pobre conformismo, bien pegado al terreno, se niegan a reconocer que en el seno de todo lo real, late siempre inexorable el misterio de la Divinidad.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) E. OTERO: «Anal. de la Real Acad. de Farmacia», 5, 673 (1944).
- (2) E. OTERO: «Anal. de Física y Química», 179 (1945); XLIII, 426, 869 (1947). E. OTERO y S. GARCÍA: Serie B. Z., 191 (1948). E. OTERO y R. RUEDA: *I Congreso Hisipano-Portugués de Farmacia*, 650 (1948).
- (3) E. OTERO, R. CADÓRNIGA y S. POMARES: «Anal. Soc. Esp. de F. y Q.», XLV, 1337 (1949).
- (4) E. OTERO y S. GARCÍA FERNÁNDEZ: «Anal. Real Soc. Esp. de F. y Q.», XLVIII, 4, 321. (1952); XLVIII. 4, 333 (1952); «Anal. da Faculdade de Farmacia de Porto», XII, 107 (1952).
- (5) R. CADÓRNIGA y E. OTERO: *Memorial des Services Chimiques de l'Etat*. XLI, 441, 387 (1956-7).
- (6) R. CADÓRNIGA, E. OTERO y MARÍA CONCEPCIÓN ARES: *Produits pharmaceutiques*, 12, XIX, 7, 441 (1957).
- (7) R. CADÓRNIGA, E. OTERO y col.: «Anal. de la Real Acad. de Farmacia», 5-6, 497 (1956); 1, 19 (1957); 1, 5 (1958); 2, 105 (1958); 2, 109 (1959).
- (8) *De la Physique Theorique a la Biologie*. Publié sous la direction de M. Marois. C. N. R. S. París, 1971.
- (9) O. L. KEPERT: «Inorg. Chem.», 8, 1556 (1969).
- (10) P. LAÍN ENTRALGO: *A qué llamamos España*, Austral, Ed. Espasa (1972)
- (11) G. BERGER: *Universidad, tecnocracia y política*. Ed. Cid (1965).
- (12) P. LAÍN ENTRALGO y J. M. LÓPEZ PIÑERO: *Panorama histórico de la Ciencia Moderna*. Ed. Guadarrama (1963).
- (13) A. DOADRIO LÓPEZ: *La química de coordinación*. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia. Madrid (1971).
- (14) P. W. HEISENBERG: *El descubrimiento de Planck*, en «EL hombre y el átomo». Ed. Guadarrama, Madrid (1959).
- (15) J. CAMÓN AZNAR: *La problemática de Theilard de Cluirdin*. Real Acad. C. Morales (1972).
- (16) J. MONOD: *El azar y la necesidad*. Ed. Barral. Madrid (1971).
- (17) A. FERNÁNDEZ CRUZ: *Polémica sobre la vida*. «A B C», (1973).
- (18) R. B. SETLOW y E. e. POLLARD: *Molecular Biophysics*. Ed. Addison-Wesley, Londres (1968).
- (19) K. MENDELSSOHN (véase 8), pág. 51.
- (20) H. FROLICH (véase 8), pág. 17.
- (21) G. NATTA y M. FARINA: *Stereo Chemistry*. Longman. Londres (1972).
- (22) I. LACZKO, K. KOVACS, M. GARAY y A. GARAY: Abstracts. *IV International Biophysics Congress*. 1, 82, Moscú (1972).
- (23) W. A. ENGELHARDT: *First European Biophysics Congress Proceeding*, IV, 1. Viena (1971).
- (24) W. THORPE: «New Scien.», 43, 635 (1969).
- (25) A. KOESTLER y J. SMYTHIES: *Beyond Reductionism*, Hutchinson. Londres (1969).

- (26) J. NEEDHAM: *Order and Life*. M. I. T. Press Cambridge. Londres (1968).
- (27) A. EDDINGTON: *The Nature of Physics*. An. Harbor (19:8).
- (28) F. JACOB: *La logique du vivant*, Gallimard. París (1970).
- (29) A. LWOFF: *L'ordre biologique*. R. Laffont. París (1969).
- (30) S. B. STEFANOV: Abstracts. *IV International Biophysics Congress*, 4, 4.80. Moscú (1972).
- (31) G. NATTA y M. FARINA (véase 21), pág. 80.
- (32) G. SARTON: *La Vida y la Ciencia*. Ed. Espasa. Madrid (195:t).
- (33) D. S. SCHONLAND: *La simetrie moleculaire*. Ed. Gauthier. París (1971).
- (34) R. W. WOODWARD y R. HOFFMAN: *Conservación de la simetría orbital*. Ed. Alhambra (1972).
- (35) I. PRIGOGINE: *Introduction to Thermodynamics of Proceses Irreversibles*. John Wiley. New-York (1967).
- (36) J. POLONSKY (véase 8), pág. 4-1.
- (37) D. JORDANO BAREA: «Anal. Universidad Hispalense», XXVI, 99 (1966).
- (38) D. JORDANO BAREA: «Portugalie. Act. Biol.», X, 1-2, 162 (1967).
- (39) A. L. LEHNINGER: *Bioenergetics*, Ed. W. A. Benjamin. New-York (1965).
- (40) P. O. LOWDIN (véase 8), pág. 46.
- (41) H. FROHLICH (véase 8), pág. 18.
- (42) H. FROHLICH: Idem, pág. 19.
- (43) G. CARERI: *Theoretical Physics and Biology*, M. Marois. North-Holland. Amsterdam (1969); G. CARERI y col.: «Phys. Lett.», 31, A. 343 (1970); W. FARIBANK, K. MENDELSSOHN y C. CARERI (véase 8), págs. 96 y 97.
- (44) K. MENDELSSOHN (véase 8), pág. 53.
- (45) B. PULLMAN: *Molecular Associations in biology*. Acad. Press. París (1968).
- (46) S. E. LURIA: *Membrane models and the formation of biological Membranes*. Ed. Bolis y Pethica. North-Holland. Amsterdam. pág. 239 (1968).
- (47) O. JARDETZKY: «Biopol. Symp.», 1, pp. 501 (1964).
- (48) P. O. P, Ts'o. (véase 45), pág. 39.
- (49) H. A. NASH y D. F. BRADLEY: «Biopolymers», 3, 261 (1965); «J. Chem. Phy.», 45, 1380 (1966).
- (50) A. DE VOE y E. TINOCO: «J. Mol. Bio.», 4, 500 (1962).
- (51) A. PULLMANN y B. PULLMANN: *Quantum theory of Atoms, Molecules and the Solid State*. Acad. Press., pág. 345 (1966).
- (52) A. SZENT-GYORGY: *Introduction to a Submolecnlar Biology*. Acad. Press New- York (1960).
- (53) D. E. FLEISCHMAN y G. TOLUK: "Proc. Nat. Acad. Scienc. U. S. A.», 53, 38 (1965).
- (54) O. SINAGLOU y S. ABDULNUR: «Federation Proc.», 24, 2. III, supl. 15, 13 (1965); (véase 45), pág. 427.
- (55) J. CLIFORD y B. SHEARD: «Byopolimers», 4, 1057 (1966).
- (56) H. S. FRANKY y M. W. EVANS: «J. Chem. Phys.», 13, 507 (1945).
- (57) I. PRIGOGINE: *La Recherche*, 24, 547 (1972).
- (58) S. CHANDRASEKHAR: *Hydrodinamic and Hidromagnetic Stability*. Claredon

- Press. Oxford (19G1); M. ZEMANSKY: *Heat and Thermodynamics*, New York, Mc. Graw-Hill (1969).
- (59) A. M. TURING: «Phil. Trans. Roy. Soc.», Londres. Ser. B, 237, 37 (1952).
- (60) I. PRIGOGINE (véase (35); P. GLANSDORFF y I. PRIGOGINE: *Non equilibrium Stability Theory Physica*, 46, 344 (1970); P. GLANSDORFF: *Thermodynamic Theory of Structure, Stability and Fluctuations*. Jonhn Wiley. NewYork (1971); (véase (8), pág. 162).
- (61) A. M. ZUBOTINSKY: «Biofisika», 9,306 (1964); V. A. BEBILIN, A. N. ZUBOTINSKY y A. K. ZAIKIN: «Russ. J. Phy. Chem.», 42, 1649 (1968); M. HERSCHKOWITZ-KAUFMAN: «C. R. Acad. Sec. París», 270, 1049 (1970); J. G. KASPEHCK y J. C. BRUICE: «Inorg. Chem.», 10,382 (1971).
- (62) H. DEGN: «Chem. Education», 49, 5, 302 (1972); R. T. FIELD: Idem, 308; J. F. LEFELHORZC: Idem,312.
- (63) A. I. LOTKA: «J. Phys. Chem.», 14, 217 (1910); «J. Amer. Chem. Soc.», 42, 1595 (1920).
- (64) A. BABLOYANTZ y G. NICOLIS: «J. Stat Phys.», 1, 563 (1969); G. NICOLIS y A. BABLOYANTZ: «J. Chem. Phy.», 51, 2632 (1969).
- (65) A. KATCHALSKY y G. OSTER: *Proceedings of the Membrane Simposium*. Derke University (1970); M. PAETCHET-HORWITZ, J. BERGER y A. KATCHALSKY: «Nature», 228, 63G (1970).
- (66) M. EIGEN: *Self organisation of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules*, «Naturwissenschaften», 58, 46G (1971.).
- (67) A. MARTÍN MUNICIO: *III Curso de Biología Molecular*. Universidad Complutense. pág. 9, Madrid (1970); B. A. PETHICA y M. CAMBRAI: *La Recherche*, 1, 5, 433 (1970).
- (68) E. GORTNER y E. GRENDL: «J. Exp. Med.», H. 439 (1927).
- (69) J. F. DANIELLI y H. DAWSON: «Biochem. J.», 30, 316 (1936).
- (70) J. D. ROBERTSON: «Prog. in Biophy and Biophy. Chem.», 10, 354 (1960).
- (71) J. D. ROBERTSON: *Celular Membranes in Development*. Ac. Press. Londres (1964).
- (72) J. B. FINEAN y col.: «J. Cell. Sec.», 1, 287 (1966).
- (73) B. A. PETHICA: «Soc. Chem. Ind. Monograph», 19, 84 (1965).
- (74) J. LENARD y S. J. SINGER: «Proc. Nat. Acad. Sci. C. S. A.», 56, 1828 (1966).
- (75) J. L. KAVANAU: «Nature». Londres. 198, 525 (1963).
- (76) J. A. LUCY: «J. Theor. Biol.», 7, 360 (1964).
- (77) F. S. SJÖSTRAND: «Protoplasme». 6, 248 (1960).
- (78) A. A. BENSON y S. J. SINGER: *Symposium of Chemical and Biological Functions of Cell membranes*, 150th National Meeting of A. C. S. Sept. 9 (1965).
- (79) A. A. BENSON: «J. Amer. Oil Chem. Soc.», 43, 312 (1966). *Membranes Models and the formation of Biological Menbranes*. North. Holland Publishing Amsterdan (1968).
- (80) D. E. GREEN y col. «Arch. Biochem. Biophy». 119, 312 (1967); «Proc. North Acad. Sci. U. S. A.». 55 (1966).

- 81) W. STOECKENIUS y D. M. ENGELMAN: «J. Cell. Biol.», 49, 613 (1969).
- 82) S. J. SINGER: *Structural: and Function of Biological Membranes*. Acad. Press, New-York, pág. 145 (1971); S. J. SINGER y G. L. NICOLSON: «Sciences», 175, 4023, 720 (1972).
- 83) K. MÜHLETHALER: «Chem. and Phys. of Lipids», 8, 4, 259 (1972).
- 84) M. R. OTERO PASTOR y M. ORTEGA MATA: «Anal. Real Acad. Farmacia», XXXVIII, 2, 211 (1972).
- 85) G. L. NICOLSON y S. J. SINGER: «Proc. North. Acad. Sci. U. S. A.», 68, 942: (1971).
- 86) T. R. PODLESKI y J. P. CHANGEUX: *Fundamental Concepts in Drug Receptor Interactions*. Acad. Press, pág. 93 (1969).
- 87) M. NOMURA: «Proc. Nat. Acad. Se. U. S.A», 52, 1514 (1964); D. EPEL y col.: *The Cell Cycle*. Acad. Press, pág. 279. New-York (1969); MSONENBERG: «Biochem. Biophys. Res. Commun», 36, 450 (1969); «Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.», 68, 1051 (1971).
- 88) J. P. CHANGEUX y col.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», 57, 335 (1967).
- 89) L. L. M. VAN DEENEN: *III Curso de Biología Molecular*. Universidad Complutense. Madrid (1970), pág. 175; L. I. ROTHFIELD: *Structure and Function of Biological Membranes*. Academic Press. (1971).
- 90) P. A. WINSOR: «Chem. Rev.», 68, 1 (1968); P. EKWALL, L. MANDELL y K. FONTEL: *V Congres International de la Detergence*, II, 2:º, 1059, Barcelona (1966); D. DERVICHIAN: «Mol. Cryst.», 2, 55 (1966); V. LUZATTI: *III Curso de Biología Molecular*. Universidad Complutense, pág. 90. Madrid (1970); D. CHAPMAN: Idem, 326.
- 91) Y. K. LEVINE y M. G. H. WILKINS: «Nature». Londres. 230, 69 (1971).
- 92) P. JOST y col.: «J. Mol. Biol.», 59, 77 (1971).
- 93) M. e. PHILLIPS: *Progress in Surface and Membrane Science*. Acad. Press. vol. 5, pág. 159 (1972).
- 94) H. TRAUBLE; «Naturwissenschaften», 58, 277 (1971).
- 95) H. TRAUBLE y col.: Abstracts. *IV International Biophysics Congress*. 71. Moscú (1972).
- 96) J. C. METCALFE y col.: «Nature», 233 (1971); EG. TINNER, A. G. FLOOK y H. HAUSER: «Biochem Biophys. Acta», 260, 49 (1972).
- 97) E. OTERO AENLLE y R. CADÓRNIGA CARRO: «Anal. Soc. Esp. de F. y Q», Ir (B), 9-10, 515 (1955).
- 98) Y. HENDRICK y L. TER MINASSIAN SARAGA: «Compt. Rendus des Sciences de l' Acad. des Sciences», 276 C, 13, 1075 (1973).
- 99) E. OTERO AENLLE, S. LEAL LÓPEZ y S. GARCÍA FERNÁNDEZ: "Anal. Soc. Esp. F. y Q.", Serie B, LXIII, II, 1021. (1967).
- 100) D. M. ENGELMAN: «J. Mol. Biol.», 58, 153 (1971).
- 101) D. L. MELCHIOR y col.: «Biochem. Biophys. Acta», 219, 114 (1970).
- 102) M. C. PHILLIPS y col.: «Chem. Phy. Lipids», En prensa. Comunicación privada.
- 103) S. ELETH, A. D. BEITH: Abstracts. *IV International Biophysics Congress*: 3, 20. Moscú (1972).

- (104) I. C. P. SMITH: «Chimia», 25, 11, 349 (1971).
- (105) R. A. DENIEL, L. L. M. VAN DEENEN y B. A. PETHICA: «Bioch. Biophys. Acta», 11, 135 (1971).
- (106) D. CHAPMAN y S. A. PENKETT: «Nature», 211, 1304 (1966).
- (107) D. CHAPMAN y D. F. H. WALLACH: *Biological Membranes*. Acad. Press, página 151 (1968).
- (108) D. L. D. CASPAR y D. A. KISCHNER: «Nature», 46, 231 (1971).
- (109) E. OTERO AENLLE, O. VALLS y M. CASTILLO: *Congrés International de la Detergence*. II, 1ª part., 413, Barcelona (1968); ISABEL CAYRE SERRANO: Tesis Doctoral (1971).
- (110) E. OTERO y R. M. CASTRO RUÍZ: Investigaciones inéditas.
- (111) E. OTERO y R. M. CASTRO RUÍZ: Investigaciones inéditas.
- (112) A. BAGMAN y col.: «J. Mol. Biol.», 13, 238 (1965).
- (113) E. N. WILLMER: «Biol. Rev.», 36, 368 (1961).
- (114) A. VENTAYOL, M. CASTILLO y E. OTERO AENLLE: Investigaciones inéditas. Primeros resultados enviados al Congreso de la F. I. B. Estocolmo (1973).
- (115) G. SISSA: «Proc. Fed. Arner, Soc. exp. Biol.», 25, 358 (1966).
- (116) I. C. P. SMITH y col.: Investigaciones inéditas. Comunicación privada. (117) I. C. P. SMITH y col.: Comunicación privada. «Bioch. Lab. Nat. Research Council of Canada-Ottawa». En prensa.
- (118) A. D. BANGHAM y col.: «Nature». Lond., 208, 1295 (1965).
- (119) B. HILLE: «Nature». Londres, 210, 1220 (1966).
- (120) I. C. P. SMITH: Comunicación privada.
- (121) J. CERBON: «Biochim. Biophys. Acta», 290, 51-57 (1972).
- (122) C. A. HARDY y col. *IV Lnternational Biophysics Congress*, Abstracts. 3, 65. Moscú (1972).
- (123) J. C. SKOU y col.: «Acta Pharmacolog. Toxicolog.», 10, 281, 292, 297, 305, 317, 325 (1954); Idem., 13, 204 (1961).
- (124) E. OTERO AENLLE y E. OTERO PASTOR: *First European Biophysics Congress*. E/IV, 2, 403. Viena (1972).
- (125) E. OTERO PASTOR y E. OTERO AENLLE: *IV International Biophysics Congress*. En prensa. Moscú (1972).
- (126) E. G. PROUDFOOT: Ph. D. Theses. Universidad de Leeds (1971).
- (127) R. C. CAYE y S. G. PROUDFOOT: "J. Pharm, Pharmac.», 23, Suppl., 223 S (1971).
- (128) J. R. SENIOL: «J. Lipids. Rev.», 5,495 (1964).
- (129) A. F. HOFMANN: *Molecular Association in Fat Digestion*, en «Molecular Association in Biological and Related Sistems». «Amer. Chem. Society». Publications, pág. 53 (1968).
- (130) N. K. ADAM, F. A. ASKEW y J. F. DAINIELLE: «Biochen. J.», Londres, 29, 1786 (1935).
- (131) E. OTERO AENLLE: *Memorial des Services chimiques de l'Etat*, 38, 2139 (1953); J. GUASTALLA: «C. R. Acad. Sc.». 1939, 208 (1937).

- (132) E. OTERO y R. CADÓRNIGA: *III Congreso Hispano Portugués de Farmacia*. II, 148 (1954); E. OTERO y R. CADÓRNIGA: "Anal. de la Real Soc. Esp. de F. y Q.", serie B, 9-10, 515 (1956); OTERO E.: *Memorial des Services Chimiques de l'Etat*, 61, 375 (1956-57).
- (133) P. EKWALL, R. EKHALIM y A. NORMA: «Act. Chem. Scand.», 2, 693 (1957).
- (134) P. EKWALL y R. EKHALIM: «Proc. International. Cong. Surface Activity», 1, 310 (1957).
- (135) A. LEAL, S. GARCÍA y E. OTERO AENLLE: «Anal. Real Soc. Esp. F. y Q.». LXIII, 11, 10, 27 (1967).
- (136) D. M. SMALL: *Molecular Association in Biological anti Related Systems*, «Amer. Chem. Soc.», pág. 41 (1968).
- (137) P. DESNUELLE, T. MOLINES y D. G. DERVICHIAN: «Bull. Soc. Chem. de France», 18, 197 (1951).
- (138) E. OTERO AENLLE y S. CARCÍA: *International Congress of Surface Activity*, II, 94. Colonia (1960).
- (139) E. OTERO AENLLE y S. CARCÍA: *IV International Congress of Surface Activity*, Estocolmo (1963).
- (140) S. CARCÍA, A. LEAL y E. OTERO: "Anal. de F. y Q.». LX, 2-3, 137 (1964).
- (141) A. LEAL, S. CARCÍA y E. OTERO: «Kolloid Zeitschrift.». 21.1., 1-2. 131 (1966).
- (142) D. G. DERVICHIAN: *Surface Phenome in Chemistry and Biology*, Londres. 10 (1958); L. SALEM: «Nature», 193, 476 (1962).
- (143) D. M. SMALL: «Adv. Chem. Ser.». 84, 31 (1968).
- (144) D. G. DERVICHIAN: *Molecular Association in Biological and Related Systemis*, «Amer. Chem. Soc.». 78 (1968).
- (145) K. D. DREHER, T. H. SCHULMAN y A. H. HOFFMAK: Investigaciones inéditas.
- (146) B. ISAKSON: «Acta. Soc. Med. Upsalien», 59, 296 (1953-54). Idem, 333.
- (147) M. BOURGES, D. M. SMALL y D. C. DERICHIAN: «Bioch. et Biophys. Act.», 125, 563 (1966); 137, 157 (1967); 144, 189 (1967).
- (148) M. F. OLSZEEWSKI, A. SAUPE y col.: «Nature». 242, 5396 336 (1973).
- (149) H. NETTER: *Theoretical Biochemistry*. Ed. Oliver and Body. Edimburgo (1969).
- (150) A. SANTOS RUÍZ: *Vida y Espíritu ante la Ciencia de hoy*. Ed. Rialp. Madrid (1970).

DISCURSO
DE
CONTESTACIÓN

POR EL EXCMO. SR. D. RICARDO
MONTEQUI y DÍAZ DE PLAZA.

Excelentísimos señores:

Señoras y señores:

Apenas se ha extinguido el eco de las palabras elogiosas para mi persona que hace poco más de un año pronunció en este mismo salón el Dr. Doadrio, al hacer su ingreso como Miembro de número de la Corporación. Al referirse a mí, lo hizo en tales términos que yo hube de disimular la emoción con las anécdotas, y califiqué, con justicia, sus palabras de hiperbólicas y excesivamente generosas. Ahora, al dar la bienvenida en nombre de esta Real Academia al profesor Otero, también discípulo entrañable mío, vuelvo a encontrarme en situación parecida ante los elogios desmedidos que me dispensa. Sé que, en ambos casos, laten sentimientos de fervorosa amistad surgidos en muchos años de convivencia, sentimientos que, como es lógico, cada uno traduce en palabras de acuerdo con su peculiar estilo. También son totalmente aplicables, en el caso actual, aquellas reflexiones mías de la relación entre discípulo y maestro, y sigo opinando, como entonces, que éste es quien a la larga sale beneficioso. No tengo pues, ahora, más que expresar a Otero mi más profunda y sincera gratitud por cuanto dice de mí, aunque sepa lo que ha contribuido a sus expresiones la lente convergente de su acendrado cariño. Quiero dirigir a ambos discípulos una frase común; yo he tenido la fortuna en momentos de su juventud, de procurarles el ambiente propicio que permitiera un desarrollo feliz del germen, impulso, inteligencia y amor al trabajo que ya latían poderosos y reales en el fondo de sus almas. Y ahora me dispongo a cumplir la misión que la Academia me ha encomendado y que obliga a comenzar con un breve diseño de la trayectoria científica del profesor Otero. Ello implicará hacer referencia a algunos de nuestros contactos, pero ahora con la severa objetividad que debe ser la virtud esencial del científico.

Enrique Otero Aenlle ve la primera luz el 20 de octubre de 1913 en la villa lucense de Ribadeo, de cara al turbulento mar Cantábrico.

Es indudable que el paisaje plasma el alma, como también lo es que ningún agente moldeador del espíritu es tan poderoso como la mar. Comunica un entrañable amor a la vida, de serenidad ante sus dificultades y crea un valor expectante y una inteligencia fría, en situaciones que parecen de fuerte y casi insuperable dramatismo. La sola presencia y existencia de la mar condiciona muchos actos de cualquier espíritu reflexivo, y muy especialmente de los nacidos en sus orillas. Al fin, en los mares está la cuna de la vida, y aún palpita en ellos una casi infinita variedad de formas vitales, todavía no perturbadas antela creciente agresión humana. La condición marinera de Otero no será nunca negada y le procurará la raíz de muchas de sus mejores. cualidades y aciertos decisivos.

Bachiller con Premio extraordinario en 1930, se perfila ya desde muy joven como hombre inteligente y activo, que busca en el estudio, más o menos instintivamente, una honesta vía de redención económica y el derecho a ocupar una situación digna y decorosa en la sociedad española. De 1930 a 1934 cursó en Santiago de Compostela la carrera de Farmacia, que va compaginando con el estudio de la de Ciencias Químicas en la cual alcanzará la licenciatura en 1940. Pronto se acredita como uno de los alumnos más brillantes de su tiempo; Por eso, al conocer algunas dificultades económicas que soporta y para ayudarle en la terminación de sus estudios, el Rectorado acuerda crear para él una beca especial, cuya cuantía muy modesta, hoy parecería irrisoria. Pero lo cierto es que con ella y su firme voluntad, austeridad y espíritu de trabajo, consigue terminar la carrera de Farmacia con las máximas calificaciones incluyendo el Premio extraordinario de la licenciatura. También se le otorga el premio Carril de la Universidad de Santiago al mejor expediente académico de aquel año. En seguida es nombrado profesor ayudante de Química Inorgánica (1934-35 y 1935-36). Asiste con asiduidad y aplicación a varios cursos para postgraduados. Con el mismo entusiasmo que en la docencia se inicia en la investigación, publicando o colaborando en varios trabajos: uno de ellos aparece en los anales de la Real Sociedad Española de Física y Química en 1932, es decir, antes de que Otero hubiera terminado su licenciatura.

Con estos antecedentes, no es de extrañar que la Universidad le seleccionase entre los alumnos enviados por ella a realizar cursos en

la Universidad de verano de Santander, en 1936. Allí le sorprendió la guerra, cuyas vicisitudes enfrentó con su peculiar serenidad de espíritu, que hemos atribuido en gran medida a su condición marinera nativa. En la primera ocasión propicia, a través de Francia y por la frontera Navarra, marcha directamente a su tierra gallega. Por entonces comenzaba a funcionar en la Facultad de Farmacia de Santiago un incipiente Laboratorio de Investigación Sanitaria y elaboración de Medicamentos, al que es incorporado sin demora. Pero pronto se le reclama para formar parte como soldado en el batallón de Infantería de Lugo. Imperturbable y silencioso marchó a ocupar su puesto, y en la misma actitud se reincorporó al Laboratorio cuando fue atendida la reclamación de sus jefes poco tiempo después. Prestó en este Centro muy valiosos servicios, y cuando se creó allí la Asesoría Química de la Jefatura del Aire ocupa la subdirección, con el grado de alférez. En su momento oportuno pasa como Jefe de los Servicios Sanitarios de Farmacia al frente del Maestrazgo, hasta que llega la paz. Inmediatamente después, vuelve a reanudar su actividad docente en Santiago de Compostela, como auxiliar de Técnica Física y más tarde como encargado de curso de Química Inorgánica.

Cuando en 1940 se confió en Madrid al que ahora os habla el Departamento de Química Aplicada en el Instituto Español de Oceanografía y se le encomienda su reestructuración, ofrece a Otero un puesto en dicho Centro y se le nombra ayudante 1.º interino. Pronto había de justificar plenamente esta confianza en él, ganando en brillantes oposiciones el puesto de Oceanógrafo Químico. No es pertinente detallar ahora la extraordinaria labor de Otero en el Instituto Oceanográfico -hasta quedar excedente en 1946- bien acreditada por los numerosos trabajos que publicó y por su presencia como químico en casi todas las campañas marinas que entonces se realizaron. No diré que estas campañas fueran peligrosas, pero sí a veces inquietantes por el estado de la mar, pues estaban trazadas con un plan riguroso y no debían interrumpirse más que ante una coyuntura seriamente amenazadora. Como ejemplo de su tarea, voy a referirme tan sólo a una de ellas; la expedición llevada a cabo en 1941 en la zona canario-africana, confiando la parte biológica al profesor don Fernando Lozano y la química a don Enrique Otero. Fue una campaña modelo por diversos conceptos, en la que estuvieron cuarenta y cinco días sin

acercarse a tierra. Recogieron abundante y valioso material, analizado en parte en el propio barco y el resto, al regreso en el laboratorio de Madrid. En toda esta larga y trabajosa campaña, confirma Otero sus altas dotes científicas y se comporta ante la mar como un digno hijo de Ribadeo. Digamos, en fin, que entre otras cosas de allí salió un trabajo que se refería al «Estudio químico y físico-químico de ciertos aceites de animales marinos» que constituyó una excelente Tesis Doctoral de Otero en Farmacia con la que alcanzó la calificación máxima y posteriormente el Premio extraordinario. Por aquella época editó también una obra de «Análisis de grasas, ceras y sus mezclas comerciales» (1945), que en su época constituyó una auténtica novedad, y en la que describe los métodos de trabajo con gran precisión, como resultado de su profunda experiencia en este campo, siendo muy bien recibida por los especialistas. Todo lo que antecede y la realización de más de una docena de trabajos de investigación, acreditan la labor del nuevo Académico durante sus cinco años de permanencia en el Instituto Español de Oceanografía.

Paralelamente a esta dedicación, Otero colabora como docente en la Facultad de Farmacia de Madrid, en la que después de ser ayudante pasa a Auxiliar de la Cátedra de Técnica Física y Físico-química aplicada, que renueva gratamente sus primeras inclinaciones a la enseñanza en la Universidad de Santiago y pronto alienta en él la idea de llegar a ser también Catedrático. Tuvo la suerte de encontrar en Madrid como maestro a aquel excelente investigador, tan querido y admirado en nuestra Academia, que fue don Ramón Portillo. Otero cola hora en varios trabajos de la Cátedra y en 1944 la Real Academia de Farmacia le concede el Premio Nacional con la condición de Académico correspondiente, por su trabajo titulado «Estudio de un método físico-químico para la obtención y concentración de sustancias». Sus ensueños docentes también habían de hacerse realidad el 7 de febrero de 1946, en que obtiene, tras impecable oposición, la cátedra de Técnica física y Físico-química de la Facultad de Farmacia de Santiago. Apenas se hace cargo de la misma, rehace y mejora su laboratorio, se rodea de discípulos inteligentes y entusiastas, se desplaza al extranjero con becas y pensiones para ampliar sus estudios; realiza trabajos de investigación y dirige tesis doctorales; en fin, cuanto había de contribuir a la creación de su propia personalidad de físico-

químico, y donde ya se apunta un interés especial por contribuir a un mejor conocimiento de las interacciones moleculares en superficie. En consecuencia se le nombra Jefe de una de las Secciones de Química Física Biológica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas ... Pronto va creando discípulos y van quedando junto a él los mejores, lo que es la aspiración más noble de todo buen maestro. Entre los varios alumnos entrañables de Otero que podía citar, quiero concretarme tan sólo a los dos primeros: don Rafael Cadórniga y don Serafín García Fernández, que hoy ocupan, por méritos propios, puestos destacados en la docencia y en la investigación.

Pero en el año 1949 ocurre en la vida de Otero un acontecimiento inesperado y sorprendente. Santiago de Compostela es una ciudad de rumores, no pocos de ellos de matiz romántico. Emergen no se sabe de dónde, se difunden ampliamente, y por lo general se desvanecen como la niebla, sin dejar huella. Algunos, por excepción, se van concretando, y terminan por convertirse en hechos reales. Tal sucedió con el insistente rumor de que Santiago por su rancia y gloriosa tradición y por su intensa vida universitaria, debía de tener y esto sucedería pronto un Alcalde seleccionado entre los Catedráticos de su Universidad. Esta vez el rumor cristalizó en un decreto del 16 de julio de 1949, por el que se nombraba Alcalde de Santiago de Compostela a don Enrique Otero Aenlle. No sé con detalle cómo se plantearon las cosas. Pero yo, que conocía bien la ilimitada capacidad de trabajo de Otero, estuve siempre seguro que el cargo de Alcalde no disminuiría en nada la atención que dedicaba a sus actividades docentes e investigadoras, si no acaso lo contrario. Así sucedió, como lo acreditan sus comunicaciones científicas y el texto de Físico-química que publicó por aquellas fechas. Aunque un tanto ajeno a la línea de esta nota biográfica, me parece justo recordar aquí su gran labor en la alcaldía. La ciudad, entonces un tanto descuidada, fue objeto durante su mandato de limpieza y enlosado casi general, acertadas ampliaciones urbanas, iluminación, reparación de monumentos, creación de zonas verdes y jardines y no hay que decirlo atención preferente a todo cuanto guardaba relación con la Universidad y la expansión cultural e histórica de la Ciudad, estableciendo importantes relaciones en este sentido con el extranjero. Desde su cargo de Presidente del Patronato de Formación Profesional y Técnica, realizó asimismo una

importante tarea en la promoción y creación de Centros formativos para el mundo laboral.

Hagamos ahora un poco de pequeña historia, en la línea de las relaciones de Otero con nuestra Academia y con el inolvidable doctor Zúñiga, que tanto contribuyó al enaltecimiento de la Corporación. Recordemos que Otero era ya Académico correspondiente desde el año 1944. Pues bien el 23 de marzo de 1954, ya la personalidad de Otero en marcha ascendente, le requiere Zúñiga con vehemencia, para que le envíe alguna comunicacióncientífica, pues no se pueden celebrar las sesiones preceptivas por falta de aquéllas. La respuesta de Otero es ir publicando en años sucesivos en nuestros Anales cinco valiosos trabajos con el título general de «Propiedades interfaciales de algunos mucílago de aplicación farmacéutica». Desde entonces ha sido un habitual asistente a los actos de nuestra Academia y aun en 1972 ha presentado con sus colaboradores, dos importantes aportaciones acerca de «Aspectos termodinámicos y estructurales de las asociaciones de algunos antibióticos y tensoactivos». El año 1957 Otero es nombrado gobernador civil de Lugo. Zúñiga reacciona como lo fue siempre; celador implicable de cuanto pudiera influir en la marcha de nuestra Corporación, a cuyo servicio vivió totalmente entregado. El 4 de julio felicita con efusividad a Otero, pero termina la -carta con este párrafo redactado con su familiar estilo: «Metido hasta el cuello en la política, le dice, puede usted llegar muy lejos. Pero ¿y la Cátedra y el Laboratorio ? Ya puedo despedirme de su prometida colaboración. Pero el 28 de julio le da Otero esta firme y categórica respuesta: «Para su tranquilidad quiero decirle que mi Cátedra y Laboratorio serán dirigidas por mí en perfectas condiciones y que -el equipo que trabaja en ellos seguirá laborando bajo mi dirección y de acuerdo con las normas que yo les dictaré, ya que personalmente pienso pasar cierto tiempo cada semana en aquella ciudad, para plantear los trabajos que luego mis colaboradores han de desarrollar». Incluso dice que para algunas pruebas experimentales piensa aprovechar el laboratorio del Instituto de Higiene de Lugo. Cumple literalmente su propósito, como puede comprobarse por sus publicaciones de esas fechas, manteniéndolo invariable cuando en 1961 es trasladado a Salamanca, porque ya nada le arredra, pues se ha convertido en un verdadero maestro en lo que ahora podríamos llamar investigación

a distancia. Con el mismo criterio de continuidad opera cuando en 1965 se incorpora, por concurso, a la cátedra de Físico-química de Barcelona. En fin, en 1969 pasa a regentar la cátedra del mismo nombre en la Universidad Complutense de Madrid. El 22 de abril de 1971 es elegido por unanimidad Académico de número de nuestra Corporación. Sería larga tarea reseñar las actividades culturales de Otero en las diversas ciudades donde actuó. Daré sólo algunos esclarecedores ejemplos. En Lugo organiza unos muy bien orientados «Cursos universitarios de primavera», que alcanzaron éxito relevante en el mundo cultural de la Ciudad. En Salamanca se le halla presente en todas las instituciones y actos de algún matiz cultural, que protegía y alentaba con todas sus posibilidades. Por ejemplo, en gran medida se debe a Otero la unificación, en 1967, de determinado sector de la investigación científica, bastante dispersa entonces en Salamanca, con la creación de un bien organizado «Centro de Investigación Básica y Aplicada del Oeste de España», que significó un gran progreso para la Universidad salmantina y para el desarrollo de aquella región. Ese espíritu de protección a las investigaciones básicas está contenido en el prólogo del profesor Otero a la obra del doctor Lucena sobre «Suelos de Salamanca». Su inquietud universitaria al más alto nivel, está expresada con claridad en su publicación de 1965 titulada «Universidad y Desarrollo», en la que plantea cuestiones de innegable transcendencia y que aún hoy tienen una resonancia actual. Lo mismo ocurre con la problemática que sobre «Sanidad y desarrollo: abordó, con sinceridad, en una conferencia pronunciada con motivo de la fiesta de la Patrona en la Facultad de Farmacia de Barcelona.

En aquella Ciudad organizó en 1966, un interesante coloquio con aportaciones españolas y extranjeras, acerca de «Interacciones moleculares de ácidos biliares y ácidos grasos», que entre otras derivaciones sirvió de base a dos tesis doctorales realizadas posteriormente. En fin, en Madrid se entregó en seguida a su empresa creadora de nuevos equipos, adquisición de nuevo y moderno material y clara orientación en el desarrollo de temas de actualidad palpitante y radical exigencia.

Sería vano, y correría el riesgo de abrumar y de desviar vuestra benévola atención, si quisiera recoger y comentar ni aun lo más destacado de la obra científica de Otero, después de lo ya dicho. Bastará

la elocuencia de este resumen. Tiene en su haber más de 75 comunicaciones científicas recogidas en Revistas nacionales y extranjeras y en las actas de muy variados Congresos. A esto hay que añadir más de 30 conferencias pronunciadas sobre temas científicos, la dirección de 12 tesis doctorales y seis más en curso de realización, así como de diversas tesinas de licenciatura. Un matiz positivo de su carácter, que debo consignar, ha sido, en todo tiempo, su tendencia a asistir a Reuniones científicas fuera de España -aún en 1972 al Congreso de Biofísica de Moscú- para estar al día en la constante renovación de las ideas y tomar contacto humano con prestigiosas figuras de su especialidad. Omito la relación de las numerosas capitales visitadas por él para dejar en paz a la geografía, muy especialmente a la Europea. Pero sí debo hacer constancia de sus contactos y relaciones con los profesores Guastalla, Dervichian, Jacqué, Gillot y Luzatti de París; Thiele de la alemana Kiel; Davies de Londres; Desnuelle de Marella; Eckwal de Finlandia hoy en Estocolmo; Ruissen Defay y Delmotte de Bélgica; Trapeznikov de Moscú; Smith de Canadá; Phillips de Estados Unidos; Shinoda de Japón; y algún otro quizá olvidado por mí. Así ha mantenido en constante y fructuoso contraste internacional sus ideas y ha dado a éstas, en cada instante la medida exacta de su vigencia.

En la importante disertación que acabamos de escuchar al Dr. Otero, se enlazan conceptos teóricos de gran complejidad con los resultados de su propia experimentación personal. Por el atractivo camino de la Biofísica, nos ha llevado al conocimiento de las leyes que pueden regular ese mundo inquietante de los sistemas biológicos, en el que convergen y se entrecruzan ideas muy dispares, procedentes de campos de especialización diversos de las Ciencias Químicas y de la Física. Aunque diferentes, en su origen y en su metodología, se intenta alcanzar con ellas un conocimiento, lo más profundo posible, de los aspectos más importantes de la Biología a nivel molecular, de acuerdo con las características estructurales y conformacionales de los biopolímeros. Sin embargo el simple conocimiento de estas estructuras no sería resultado suficiente y satisfactorio, si no se pueden correlacionar éstas con su función biológica. En primer lugar es necesario conocer la estructura química, que viene condicionada por los componentes que forman el biopolímero, su tamaño, forma y or-

denamiento intramolecular, Estos parámetros, en los casos más sencillos, aunque por técnicas muy delicadas, son en general asequibles a las medidas analíticas y sobre todo a las que, en la actualidad, se encuentran en desarrollo más avanzado. En segundo lugar y debido a sus grupos funcionales, las macromoléculas tienen una reactividad que, en general, se pueden explicar por medios mecanocuánticos. Por otra parte, hay que tener en cuenta las interacciones de estas sustancias con distintas radiaciones, todo lo cual puede ser determinado mediante técnicas físicas, que aportan datos de interés para una explicación correcta de los conjuntos biológicos. Por último y es aquí donde el profesor Otero pone un énfasis especial en su discurso, es necesario conocer la situación de los sistemas biológicos en sus estados de no-equilibrio o en continuas reacciones de tipo dinámico, con unas variaciones de arquitectura molecular, que relacionando estos fenómenos con los factores termodinámicos que los rigen, establezcan un orden estable determinado. El campo de estudio se amplía con todo ello y no se concreta al terreno exclusivamente estructural, sino que abarca también al conocimiento de las fuerzas de enlace de todo tipo, que permiten establecer asociaciones moleculares idóneas, así como a la influencia de la energía libre y la entropía, para determinar una conformación privilegiada.

Los avances conseguidos en estos últimos años en el estudio de las macromoléculas, con la técnica de difracción de rayos X, espectroscopía de resonancia de spin, RMN, dispersión rotatoria, dicroísmo circular, etc., y en especial de las más complejas, las proteínas, desde los primitivos trabajos de Linus Pauling y su escuela, marcan una pauta importante a seguir en el terreno de la Biología molecular, con la que se puede obtener también una información de las funciones químicas y biológicas que aquéllas pueden realizar. Aun con esta ayuda, las dificultades casi insuperables que, en algunos casos, se presentan para establecer la estructura y conformación de moléculas tan complicadas, como las que intervienen en los procesos biológicos, ha condicionado el que se intenten encontrar modelos moleculares de laboratorio más sencillos, que permitan obtener una idea más clara de la funcionalidad de las macromoléculas de los sistemas biológicos. Sin embargo, como nos ha dicho el profesor Otero, «la mayor dificultad consiste en reducir los procesos que se presentan en la

Naturaleza, siempre refinados y complejos a un nivel asequible a la investigación, el de las moléculas y de sus conclusiones, poder deducir determinadas propiedades que sean válidas para el conjunto, ya que el conocimiento de la totalidad del sistema no puede determinarse simplemente de las propiedades de las partes que lo componen». Por ello ha adquirido un gran interés el conseguir un dominio adecuado de los procesos de integración, que con tanto interés se abordan en este discurso, con medios cada vez más elaborados para los fines que ose persiguen, conociendo con mayor rigurosidad las fuerzas de interacción moleculares que permitan establecer estructuras complejas a partir de otras más sencillas. Todo esto ha de constituir, por lo tanto, un tema importante en los estudios estructurales, por lo cual el nuevo Académico hace hincapié en este punto, poniendo ejemplos demostrativos de su necesaria contribución para fijar las conformaciones de los sistemas biológicos.

Con todo, el problema se centra, en último término en establecer el origen del orden biológico, la estabilidad de estos sistemas y su explicación a partir de las leyes generales del mundo físico. Esta cuestión es abordada ampliamente por el profesor Otero en su disertación, tanto desde el punto de vista de la Física, más o menos clásica, como desde la perspectiva de la electrónica o de la energética. Este campo de trabajo está hoy muy avanzado, debido a la posibilidad de utilizar modelos analógicos para sus investigaciones y aplicando cálculos de mecánica cuántica, poder obtener datos de referencia inestimables para el conocimiento de las energías de interacción molecular. Por otra parte, la aplicación de la termodinámica de los procesos irreversibles, en condiciones no lineales, a los sistemas biológicos, permite tener una cierta esperanza de que muchos de los enigmas de la vida que, hasta ahora parecían inexplicables, puedan ser deducibles en un contexto general de las leyes físicas naturales.

La organización estructural de las membranas celulares, tomada como ejemplo por el profesor Otero, para describir el orden y la estabilidad en un sistema biológico, pone de manifiesto cómo el conocimiento de la misma es fundamental para comprender mecanismos de tanto interés como su permeabilidad selectiva o el transporte iónico, constituyendo así uno de los capítulos más sugestivos de la notable disertación del Dr. Otero. El papel destacado que en la es-

estructura de la membrana y de aquí en su funcionalidad, desempeña la capa de lípidos nos lleva al terreno de sus investigaciones personales.

Un grupo de sus trabajos, van a estar dirigidos al estudio de monocapas de ácidos grasos, en las cuales las moléculas pueden encontrarse en diversos estados que corresponden a estructuras tridimensionales sólidas, líquidas o gaseosas. Entre otros resultados importantes, se determinaron por este procedimiento las áreas moleculares que corresponden a los puntos de transición conformacional de tipo gel a estado líquido cristalino que pueden ocurrir en las membranas, deduciendo su disposición estructural y los momentos dipolares, de los datos obtenidos en monocapas. Al realizar estos estudios con soporte salino y en medio ácido, deduce Otero que, en estas condiciones, las moléculas se encuentran en su casi totalidad en forma no ionizada, no produciéndose ningún tipo de interacción entre ellas, por lo que se requieren mayores presiones para alcanzar un valor determinado del área molecular en presencia de electrolitos.

En la organización estructural de los fosfolípidos en la membrana influye de una manera especial la presencia de colesterol, por formar un complejo molecular con la lecitina. Otros esteroides análogos producen un orden semejante, mientras que al variar la configuración de los mismos puede anularse su poder ordenador. El efecto más probable de los esteroides, indica Otero, es regular la ordenación de los componentes lipídicos de la membrana y su fluidez, fijando normas a las interacciones lípido-proteína. Con ello las propiedades de permeabilidad de una membrana particular pueden ser determinadas por su contenido en lípidos y colesterol. Por esto es de sumo interés conocer la interacción del colesterol con algunos de los compuestos que tanto se utilizan hoy en día, como son los detergentes, para poder aclarar su influencia en el metabolismo general del mismo. El profesor Otero ha determinado la estructura conformacional de las asociaciones entre tween 60 y colesterol observando fases laminares, hexagonales o isotrópicas, lo que le permite dar una explicación razonable de la influencia de dichas estructuras en relación con el proceso de inmovilización o movilidad del colesterol. También se ponen aquí de manifiesto las interacciones que este esteroide presenta en capas monomoleculares, con detergentes no iónicos como el oleato y el estearato de sorbitano.

La actividad farmacológica de algunos compuestos hormonales se, considera que puede residir, asimismo, en las variaciones que éstos pueden producir en la estructura lipídica de la membrana. En este terreno ha investigado también el Dr. Otero, estudiando las propiedades de las capas monomoleculares de esteroisómeros del pregnandiol y su interacción con algunos fosfolípidos.

Los numerosos trabajos que se han efectuado en estos últimos años, respecto al mecanismo de acción de los anestésicos generales y locales han permitido establecer numerosas hipótesis del modo de actuar de estas sustancias, algunas fundadas en las modificaciones que los anestésicos pueden originar en la organización de las capas lipídicas de las membranas y con ello en la permeabilidad catiónica de éstas. La inquietud investigadora de Otero le llevó a abordar este aspecto de la estructura conformacional lipídica, con su sólida preparación en este terreno, estudiando, en primer lugar, el diagrama de fases de un modelo simple con el anestésico local lidocaina y agua. Observa notables cambios en la conformación del sistema lípido-agua por la adición del mencionado anestésico, que depende de la proporción añadida de la sustancia activa, detectando unas fases laminares y hexagonales e incluso de líquido isotrópico. Se prosiguen estos estudios en su Departamento con distintos sistemas de fosfolípidos, en presencia de colesterol y con diversos anestésicos locales, obteniéndose resultados esperanzadores, que, no dudamos, le permitan llegar a conclusiones definitivas de interés.

Como ejemplo de un proceso biológico, en el que la ordenación y estabilidad del sistema implicado en el mismo, presenta una importancia básica, plantea el profesor Otero, el mecanismo de la absorción y digestión de las grasas, en el que juegan un papel predominante la formación de asociaciones moleculares de los lípidos con las sales biliares. Ya en el año 1953 obtiene Otero, por vez primera, unas monocapas de los ácidos cólico, glicocólico, taurocólico y desosicólico, continuando estos interesantes estudios en fechas posteriores, lo que le permite deducir de las isotermas de compresión el paso de fase líquida expandida a estado líquido condensado, formándose en algunos casos un estado mesomorfo intermedio. Por el número y disposición de los grupos OH que cada compuesto posee, se explican las estructuras correspondientes a los cambios superficiales de estado

o de fases de los ácidos biliares, que corresponden a unas áreas moleculares características del estado líquido o sólido empaquetado.

En fechas más recientes ha realizado trabajos Otero en esta misma línea, estableciendo las isotermas de compresión de los ácidos biliares sobre soporte salino y a un pH muy ácido, encontrando resultados que le permiten generalizar los obtenidos al estudiar las propiedades de las monocapas de los ácidos grasos en presencia de electrolitos. Considera que cuando se trata de moléculas polifuncionales, se forman multicapas con gran facilidad, lo que corresponde a que las sales biliares puedan formar agregados unidos por sus regiones hidrófobas, que al aumentar la concentración se unen a su vez entre si, por sus zonas hidrófilas, a través de puentes de hidrógeno. El estudio de las asociaciones de ácidos biliares y ácidos grasos en capas monomoleculares mixtas, que han constituido una temática general de varios de sus trabajos, le han permitido establecer unas ideas teoricas generales del comportamiento de estas mono capas y de los cambios que en ellas se producen en función de la ordenación estructural. Esto ha posibilitado el abordar el comportamiento de las sales biliares en la formación de agregados micelares con los ácidos grasos, en el conjunto de la bilis humana y los cambios que en ella se pueden producir en función de las conformaciones producidas, apuntándose así la génesis de la formación de los cálculos biliares.

Cerramos este breve comentario al valioso discurso del profesor Otero, invitando al oyente a que lo considere con más calma. En una 'lectura completa y con tranquila meditación le encontrará aún más atractivo y sugerente y apreciará mejor algunas de las profundas ideas aquí expuestas, que rozan el campo fascinante de la filosofía natural de los siempre maravillosos para nosotros fenómenos biológicos. Todo ello visto a través de la cada vez más consolidada Biofísica, Ciencia a cuyo cultivo se inclinan actualmente Otero y sus colaboradores. Sus estudios tenían que determinar contactos importantes con la Biofarmacia, ciencia en formación y más específica para ellos profesionalmente. Es muy significativo que en España se considere ya, a uno de los más relevantes discípulos del profesor Otero Aenlle, como pionero indiscutible de los estudios biofarmacéuticos en nuestro país.

El acto que ahora va a terminar suele designarse como ingreso

de un Académico numerario, pero en este caso particular es también el legítimo ascenso de un científico, que desde hace muchos años, está vinculado a esta Real Academia, como oportunamente hemos recordado. Llega ahora a la superior categoría en plena madurez intelectual, con méritos indiscutibles y con relevantes servicios prestados a la Corporación. Al darle la más cordial bienvenida como numerario, podemos estar seguros de que estos servicios han de continuar con el mismo entusiasmo, amor y desinterés, de los que tantas pruebas tiene dado ya.